P. 11

# annales de technologie agricole

CENTRE NATIONAL DE RECHERCHES AGRONOMIQUES
SERVICE DE DOCUMENTATION
7 OCT. 1975

Trimestriel

1975

Vol. 24 . N°1

inra

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE
Ann. Technol. agric. ATAPAA 24 (1) 1-115 (1975)
FR ISSN 0003-4223

# INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

149, rue de Grenelle, 75007 PARIS Tél. : 551-41-09

Directeur général : R. FÉVRIER
Directeur général adjoint : J. POLY
Inspecteurs généraux : E. BIBLIOTTI, P. BOUVAREL, C. CALET, A. CAUDERON,
G. FAUCONNEAU, P. MORNET, R. PÉRO, J. REBISCHUNG

## Rédaction des Annales

Pour l'ensemble des Séries : J. POLY

***Annales agronomiques.***

— J. CHAUSSIDON, Chef du Département de Science du Sol, C. N. R. A.
— L. GACHON, Chef du Département d'Agronomie, 63100 Clermont-Ferrand.
— M. HALLAIRE, Chef du Département de Bioclimatologie, C. N. R. A.

***Annales de l'Amélioration des Plantes.***

— M. RIVES, Chef du Département de Génétique et d'Amélioration des Plantes, I. N. R. A., 11, rue Jean-Nicot, 75007 Paris.

***Annales de Phytopathologie.***

— J. PONCHET, Chef du Département de Pathologie végétale, 06602 Antibes.

***Annales de Zoologie-Écologie animale.***

— E. BIBLIOTTI, Inspecteur général de la Recherche agronomique.

***Annales de Zootechnie.***

— A.-M. LEROY, Professeur honoraire à l'Institut national agronomique.
— A. RÉRAT, Chef du Département de Nutrition, C. N. R. Z.

***Annales de Technologie agricole.***

— P. DUPUY, Chef du Département de Technologie des Produits végétaux, 21034 Dijon Cedex.
— A. GUILBOT, Directeur de la Station de Biochimie et Physico-Chimie des Céréales et de leurs Dérivés C. E. R. D. I. A., Le Noyer-Lambert, 91300 Massy.
— B. L. DUMONT, Directeur du Laboratoire de Recherches sur la Viande, C. N. R. Z.

***Annales de Biologie animale, Biochimie, Biophysique.***

— G. FAUCONNEAU, Inspecteur général de la Recherche agronomique.
— A. FRANÇOIS, Directeur de Recherche à l'I. N. R. A., Directeur du Centre national de Coordination des Études et Recherches sur la Nutrition et l'Alimentation.
— C. THIBAULT, Chef du Département de Physiologie animale, C. N. R. Z.

***Annales des Sciences forestières.***

— P. BOUVAREL, Inspecteur général de la Recherche agronomique, Chef du Département de Recherches forestières, C. N. R. F.
— J.-P. CHESNEAU, École nationale du Génie rural, des Eaux et des Forêts, 54000 Nancy.
— J. PARDÉ, Directeur de la Station de Sylviculture et de Production, C. N. R. F.

***Annales de Génétique et de Sélection animale.***

— P. MÉRAT, Directeur de la Station de Génétique factorielle, C. N. R. Z.
— B. VISSAC, Chef du Département de Génétique animale, C. N. R. Z.

***Apidologie*** (Revue franco-allemande, co-édition I. N. R. A.-Deutscher-Imkerbund).

— J. LOUVEAUX, Directeur de la Station de Recherches sur l'Abeille et les insectes sociaux 91440 Bures-sur-Yvette.

***Annales de Recherches vétérinaires.***

— P. MORNET, Inspecteur général de la Recherche agronomique.
— P. LARVOR, Directeur de la Station de Physiopathologie de la Nutrition, Saint Genès Champanelle, 63110 Beaumont.

***Annales d'Hydrobiologie.***

— C. THIBAUT, Chef du Département de Physiologie animale, C. N. R. Z.
— J. LECOMTE, Chef du Département d'Hydrobiologie, C. N. R. A.

## ADMINISTRATION ET SECRÉTARIAT DE LA RÉDACTION

Services des Publications de l'I. N. R. A., route de Saint-Cyr, 78000 VERSAILLES, Tél. : 950-75-22

*Ann. Technol. agric.*, 1975, **24** (1).

# CONTENTS

M. A. Vijayalakshmi, P. Dupuy. — Juice extraction of frozen apple pulp ............ 1

P. Feillet, R. Alary. — Rice parboiling. Effects of processing conditions and varietal factors on the milled rice characteristics ............ 11

G. Linden, D. Lorient. — Determination of iron in cheese whey by atomic absorption spectrometry ............ 25

M. Namory. — Preservation of wet yeast for animal feeding ............ 35

C. Valin, Olga Palanska, R. Gouttefongea. — Study of the quality of cattle meat. I. — Biochemical study of the aging of young bull meat ............ 47

D. Richard-Molard, R. Drapron. — Extraction and concentration of the volatile constituents of cereal grains with a view to their analysis by gas chromatography ............ 65

J. Riviere, C. Gary, J.-C. Vergnaud, J. Cabannes. — Action of magnetic and electric fields on the growth and mutation rate of various micro-organismes ............ 75

P. Carmona, Juana Bellanato, A. Hidalgo. — Study of orange essential oils. I. — Analysis by infrared spectroscopy ............ 83

J.-F. Thibault, J.-P. Robin. — Automation of uronic acid titration by the carbazol method : application to the case of pectic substances ............ 99

*Informations* ............ 111

*Book reviews* ............ 115

*Ann. Technol. agric.*, 1975, **24** (2).

# TABLE DES MATIÈRES

R. DRAPRON. — Méthode rapide de détermination quantitative des lipides totaux dans les produits céréaliers ..... 117

G. ALBAGNAC. — La décarboxylation des acides cinnamiques substitués par les levures ..... 133

Jutta CERNING-BEROARD, A. GUILBOT. — Évolution de la composition glucidique des grains de céréales au cours de leur maturation : maïs, blé, orge ..... 143

R. CORDONNIER, C. BIRON, A. DUGAL. — Les invertases du raisin et de *Saccharomyces cerevisiae*. Leur participation respective à l'hydrolyse du saccharose ajouté à la vinification ..... 171

J. LABADIE, Jeanne FOURNAUD, B.-L. DUMONT. — Relations entre le pH et la microflore des viandes hachées de bovins ..... 193

M. BURET, Y. CHAMBROY, C. FLANZY. — Métabolisme anaérobie de la baie de raisin en milieu liquide. I. — Aspects méthodologiques ..... 205

*Mise au point.*

M. SOUTY, P. ANDRÉ. — Composition biochimique et qualité des pêches ..... 217

# CONTENTS

R. DRAPRON. — Rapid method for the quantitative determination of total lipids in cereal products ..... 117

G. ALBAGNAC. — Decarboxylation of subtituted cinnamic acids by yeasts ..... 133

Jutta CERNING-BEROARD, A. GUILBOT. — Changes in the carbohydrate composition during maturation of the maize, wheat and barley kernel ..... 143

R. CORDONNIER, C. BIRON, A. DUGAL. — The invertases of the grape and *Saccharomyces cerevisiae* : their respective participation in the hydrolysis of saccharose added in vinification ..... 171

J. LABADIE, Jeanne FOURNAUD, B.-L. DUMONT. — Relationships between the pH and the microflora of beef and veal ground meat ..... 193

M. BURET, Y. CHAMBROY, C. FLANZY. — Anaerobic metabolism of the grape berry in liquid medium. I. — Methodologic aspects ..... 205

*Review.*

M. SOUTY, P. ANDRÉ. — Quality and peaches constituents ..... 217

*Les Annales de Technologie agricole figurent dans Current Contents*

I. N. 5. 036. 064. 5

# INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

## PÉRIODIQUES

| TARIF DES ABONNEMENTS POUR 1976 | France | Étranger | Le N° |
|---|---|---|---|
| ANNALES AGRONOMIQUES, 6 n$^{os}$ par an | 270 F | 296 F | 65 F |
| ANNALES DE L'AMÉLIORATION DES PLANTES, 4 n$^{os}$ par an | 210 F | 232 F | 65 F |
| ANNALES DE PHYTOPATHOLOGIE, 4 n$^{os}$ par an | 240 F | 264 F | 85 F |
| ANNALES DE ZOOLOGIE-ÉCOLOGIE ANIMALE, 4 n$^{os}$ par an | 240 F | 264 F | 85 F |
| ANNALES DE ZOOTECHNIE, 4 n$^{os}$ par an | 240 F | 264 F | 85 F |
| ANNALES DE TECHNOLOGIE AGRICOLE, 4 n$^{os}$ par an | 210 F | 232 F | 65 F |
| ANNALES DE BIOLOGIE ANIMALE, BIOCHIMIE, BIOPHYSIQUE, 4 n$^{os}$ par an (1) | 270 F | 296 F | 65 F |
| ANNALES DES SCIENCES FORESTIÈRES, 4 n$^{os}$ par an | 210 F | 232 F | 65 F |
| ANNALES DE GÉNÉTIQUE ET DE SÉLECTION ANIMALE, 4 n$^{os}$ par an. | 240 F | 264 F | 85 F |
| ANNALES DE RECHERCHES VÉTÉRINAIRES, 4 n$^{os}$ par an | 240 F | 264 F | 85 F |
| ANNALES D'HYDROBIOLOGIE, 2 n$^{os}$ par an | 125 F | 140 F | 85 F |

(1) En 1976, les *Annales de Biologie animale, Biochimie, Biophysique* passeront de 4 n$^{os}$ à 6 n$^{os}$ par an.

APIDOLOGIE, 4 n$^{os}$ par an — Abonnement : France : 60 F — Étranger sauf R. F. A. : 70 F
— Le numéro : France : 20 F — Étranger sauf R. F. A. : 25 F

## DERNIERS OUVRAGES PARUS

**Carte pédologique de France au 1/100 000. Angoulême H-16 et notice explicative** par **G. Callot.**
171 p. et une carte, 1975 ..... 53,50 F

**Carte pédologique de France au 1/100 000. Moulins L-14 et notice explicative** par **J. C. Favrot.**
177 p. et une carte, 1974 ..... 53,50 F

**Carte pédologique de France au 1/100 000. Toulon P-23 et notice explicative** par **J. Portier.**
107 p. et une carte, 1974 ..... 53,50 F

**Journées d'information sur l'alimentation azotée des animaux, Paris, 21-22 novembre 1973.**
141 p., 1974 ..... 52,00 F

**L'I. N. R. A. au service des Industries agricoles et alimentaires. Inventaire des Recherches.**
266 p., 1974 ..... 35,00 F

**Symposium international sur la conservation des grains récoltés humides, Paris, 5-10 mars 1973.**
762 p., 1973 ..... 150,00 F

**Le Pois. Étude génétique des caractères, classification, caractéristiques variétales portant sur les variétés inscrites au catalogue officiel français,** par **R. Cousin.**
111 p. et 140 fiches, 1974 ..... 150,00 F

**Contribution à l'étude de la Faune de France. Systématique de la tribu des Scymnini (Coccinellidae),** par **J. M. Gourreau.**
223 p., 1974 ..... 85,00 F

**Les arbres et arbrisseaux acclimatés en région méditerranéenne française. Catalogue commenté,** par **P. Augé, P. Allemand, R. Hamès.**
144 p., 1973 ..... 58,85 F

**Colloque sur l'ovogenèse et la folliculogenèse, Nouzilly, 14-16 déc. 1972.**
258 p., 1973 ..... 120,00 F

**Protoplastes et fusion de cellules somatiques végétales, Versailles, 11-15 septembre 1972. Coédition I. N. R. A. - C. N. R. S.**
549 p., 1973 ..... 160,50 F

**Recherches acridiennes à Madagascar.**
262 p., 1972 ..... 80,00 F

**IV$^{e}$ Conférence du groupe international d'étude des virus et des maladies à virus de la vigne, Colmar 16-18 juin 1970.**
211 p., 1972 ..... 60,00 F

**Lombriciens de France, Écologie et Systématique,** par **M.-B. Bouché.**
671 p., 1972 ..... 150,00 F

Les demandes d'abonnements et les commandes doivent être adressées au Service des Publications de l'Institut national de la Recherche agronomique, route de Saint-Cyr, 78000 Versailles.
Règlement : par chèque bancaire à l'ordre du Régisseur des Publications de l'I. N. R. A., par virement postal à son compte courant : 9064-43 Paris, sans mentionner d'adresse, ou par bons U. N. E. S. C. O.
Les demandes peuvent être souscrites également par l'intermédiaire des libraires dans les conditions habituelles.
A Paris, bureau de vente : 11, rue Jean-Nicot.

*Ann. Technol. agric.*, 1975, **24** (3-4).

# CONTENTS

## SYMPOSIUM INTERNATIONAL SUR LE RHUM ET ALCOOLS DÉRIVÉS DE LA CANNE A SUCRE

D. A. ALLAN. — Less volatile alcohols esters and hydrocarbons in a raw Australian rum . . 239

J. BRICOUT, Y. MÉNORET. — Stable isotope content of rum and of the main spirits . . . . . . . 247

G. CAVAZZA. — Legislation and analytical composition of rum . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . 255

P. de SMEDT, P. LIDDLE. — The position of rum in the context of spirits in general . . . . . . 269

R. DELGADO, R. JIMÉNEZ, H. LINARES, C. GUTIÉRREZ. — Culture of food yeast on mixtures of wash and cane final molasses . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . 287

Diego Vargas GUZMAN. — Techniques used to reduce evaporation losses and reclaim casks in the case of oak-casks . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . 297

P. DUBOIS, J. RIGAUD. — Qualitative and quantitative study of rums volatile components 307

J. A. P. I'ANSON. — The need for maximum product versatility in tropical distilleries of the future . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . 317

C. JOURET, J. L. PUECH. — The importance of lignin in the maturing of rum . . . . . . . . . . . 325

O. MALDONADO, R. ESPINOSA, C. ROLZ, A. E. HUMPHREY. — Technical details of a process to manufacture industrial alcohol from sugar cane . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . 335

J. MEJANE, J. PIQUOIS. — Distillation device specially designed to produce quality brandies in a continuous process . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . 343

R. J. MESLEY, D. B. LISLE, C. P. RICHARDS, D. F. WARDLEWORTH. — The analytical identification of rum . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . 361

K. MISSELHORN. — Formation acetals in rum : a kinetic study . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . 371

A. E. MOLINI. — The research and developpment program at the rum pilot of the agricultural experiment station of the University of Puerto-Rico for full utilisation of the rum distillery wastes . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . 383

A. E. MOLINI. — The rum pilot plant of the agricultural experimental station of the university of Puerto Rico : past, present, future . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . 391

S. NEMOTO. — Possibilities of utilization of butyric acid bacteria for rum making . . . . . . . 397

H. OLBRICH. — What is to be found in literature about rum production that is more than 300 years old ? . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . 411

A. PARFAIT, C. JOURET. — Formation of higher alcohols in rums . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . 421

R. PISANI. — The present and perspective legislation in France concerning rum . . . . . . . . 437

C. ROLZ, S. de CABRERA, R. ESPINOSA, O. MALDONADO, J. F. MENCHU. — The growth of filamentous fungi on rum distilling slops . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . 445

H. SUOMALAINEN. — Some general aspects on the aroma composition of alcoholic beverages . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . 453

E. D. UNGER, T. R. COFFEY, J. E. SEAGRAM, SONS I. N. C. — Production of light-bodied rum by an extractive distillation process . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . 469

# annales de technologie agricole

Trimestriel

1975

Vol. 24 . N° 1

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

Reproduction, même partielle, interdite sans autorisation des auteurs
et de l'Institut national de la Recherche agronomique
à l'exception des résumés

*Ann. Technol. agric.*, 1975, **24** (1), 1-9.

# JUICE EXTRACTION OF FROZEN APPLE PULP

M. A. VIJAYALAKSHMI and P. DUPUY

*Station de Technologie des Produits végétaux,*
*Centre de Recherches de Dijon, I. N. R. A.,*
*7, rue Sully,*
*21034 Dijon Cedex*

## SUMMARY

A freezing and thawing treatment of *Golden delicious* apple strips, prior to juice extraction, gives a twofold yield compared to the unfrozen strips and more than fifty p. 100 of the total yield is obtained with the lowest pressure applied to the pulp. The composition of this juice obtained after freezing is different from the one obtained with the unfrozen strips, the most striking difference being the viscosity evolution of the juice during a continuous pressing program.

The fruit juice extraction is a traditional operation. Now, in the modern technology, the production of a juice free from suspended solids and off-colours is a subject of much interest.

In the case of apple juice, the conventional method consists of grating the apples and pressing the resulting pulp. In some factories, a maceration of the pulp is carried out before pressing. Sometimes, a pectinolytic enzyme treatment is applied to the pulp in order to facilitate the juice extraction.

We have looked forward to introduce a prior freezing and thawing of the apple strips, before the juice extraction, as it can improve the limpidity of the juice and increase the juice yield.

A previous study of Cuenin (1972) has shown that the composition of the juice thus extracted is different from that of the juice extracted from fresh fruits. The differences observed are in the acidity, cation and pectin contents. These differences have been attributed to a most complete disruption of the cell-walls, breaking the cellular structure, allowing the enzymes to be in contact with their substrates during thawing.

The present work investigates the freezing and thawing technic applied to *Golden delicious* apples. This variety has been chosen because the juice extraction with the existing methods is not as profitable as with the cider apples.

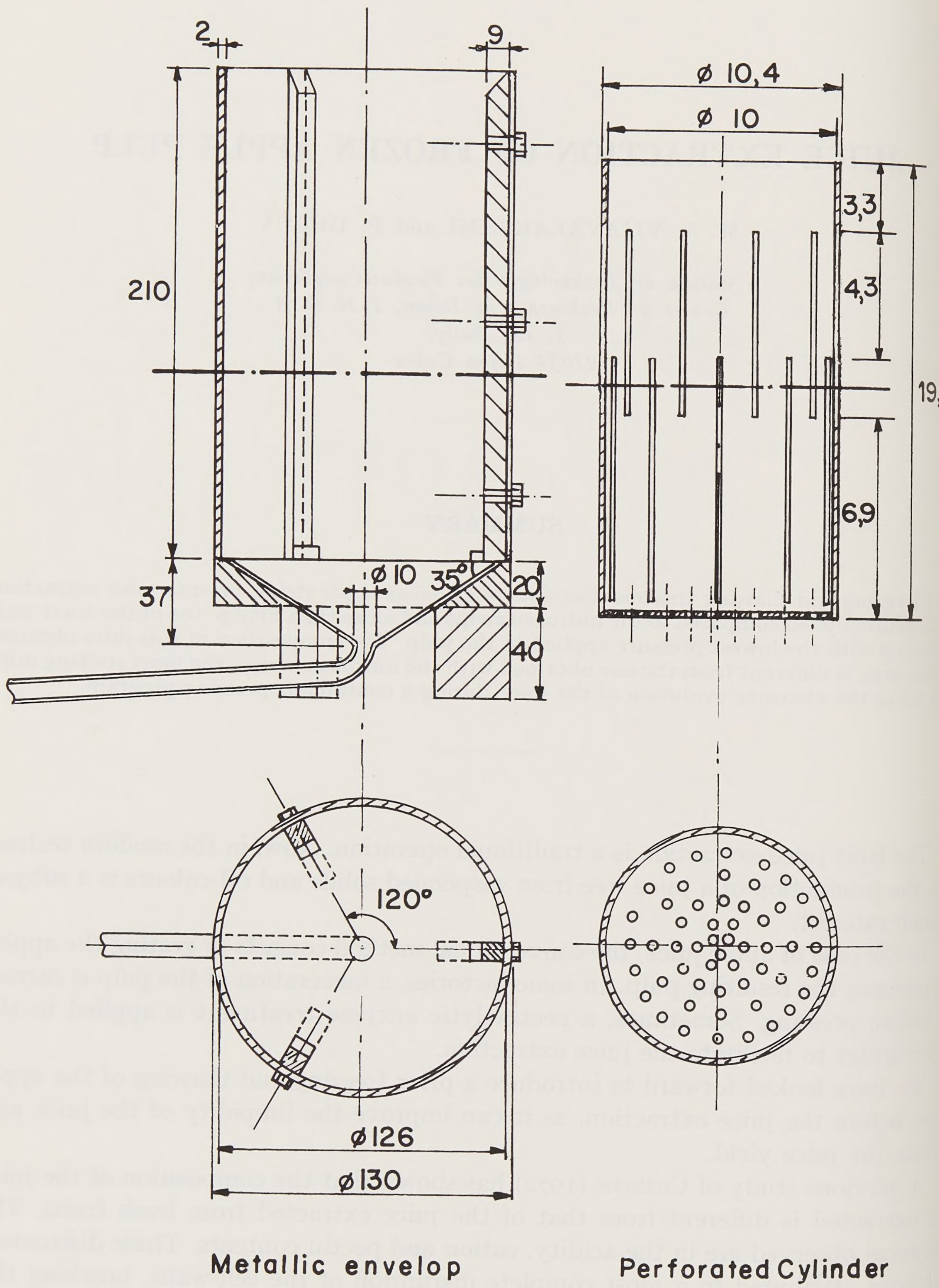



FIG. 1. — *Extraction device*

*Schéma d'extraction*

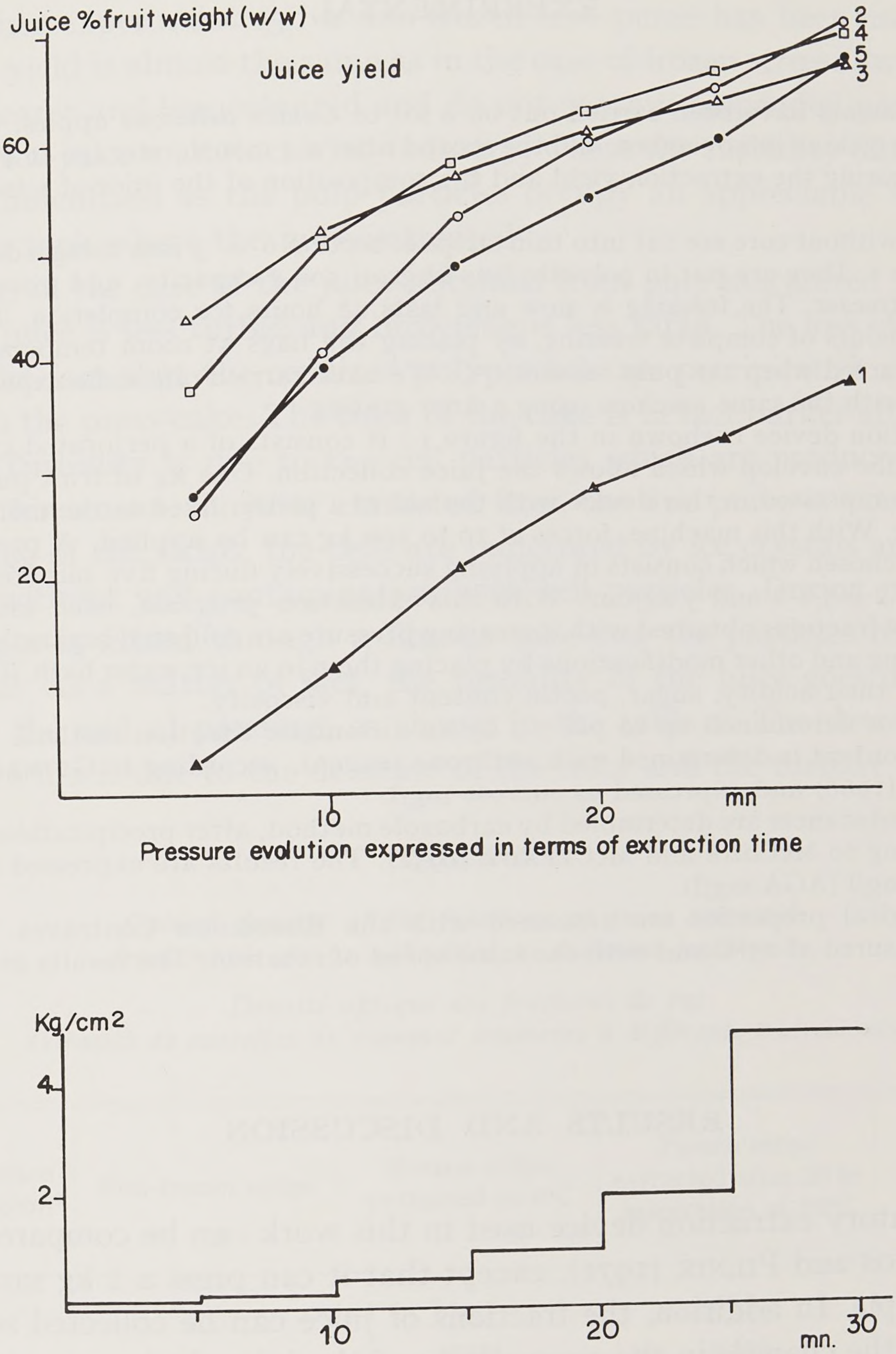



FIG. 2. — *Juice extraction as p. 100 of pulp weight*

1 : non-frozen strips ;
2 : frozen strips extracted at 0°C ;
3 : frozen strips extracted after 20 h maceration at 20°C ;
4 : freeze-dried and rehydrated strips ;
5 : non-frozen purée.

*Pourcentage de jus exprimé en p. 100 du poids de pulpe*

1 : cossettes non congelées ;
2 : cossettes congelées ; extraction à 0°C ;
3 : cossettes congelées ; extraction après 20 heures de macération à 20°C ;
4 : cossettes lyophilisées et réhydratées ;
5 : purée non-congelée.

## EXPERIMENTAL

Two experiments have been carried out on a lot of *Golden delicious* apples, the first immediately after the picking in november, and the second after a 4 months storage at 4°C. The method consists in comparing the extraction yield and the composition of the juice of a fresh sample and a frozen one.

The apples without core are cut into thin strips of section 6 × 3 mm using a domestic kitchen machine « Braun ». They are put in polyethylene bags of 500 g capacity, and frozen with the aid of a household freezer. The freezing is slow and lasts 48 hours for completion. The thawing is realised after 24 hours of complete freezing, by placing the bags at room temperature (20-22°C). The juice is extracted when the pulp reaches 0°C. We have carried out some experiments with a puree obtained with the same machine using a finer grating.

The extraction device is shown in the figure 1 ; it consists of a perforated cylinder with a concentric metallic envelop which allows the juice collection. One kg of fruit pulp placed in a nylon tissue is compressed in this device with the aid of a piston fixed to the mobile part of an Instron machine. With this machine, forces of 10 to 500 kg can be applied. A pressing program (fig. 2) has been chosen which consists of applying successively during five minutes the following pressures : 0.1-0.2-0.5-1-2 and 5 kg/cm². With this extraction program, each sample gives six fractions. The six fractions obtained with increasing pressure are collected separately and prevented from browning and other modifications by placing them in an ice water bath. These fractions are analysed for their acidity, sugar, pectin content and viscosity.

The acidity is determined up to pH 7.9 by an automatic titration method.

The sugar content is determined with anthrone reagent, according to GUIMBERTEAU (1960) and DE BRUYN (1968) and expressed as sucrose mg/l.

The pectic substances are determined by carbazole method, after precipitation with 80 p. 100 ethanol, according to MCCOMB and MCCREADY (1952). The results are expressed as anhydrogalacturonic acid mg/l (AGA mg/l).

The rheological properties are measured with the Rheometer Contraves. The apparent viscosity is measured at 25°C and with the same speed of rotation. The results are expressed as centipoises.

## RESULTS AND DISCUSSION

The laboratory extraction device used in this work can be compared to that of BELTMAN, DEVOS and PILNIK (1971), except that it can press a 1 kg sample instead of a 100 g sample. In addition, the fractions of juice can be collected separately in order to study the changes in the composition of the juice during pressing.

### *Yield and appreciation of juice quality*

The figure 2 shows the volumes of juice extracted at different levels of pressure applied to apple strips. When they are fresh, the yield of juice is 35 p. 100 by weight at the end of the program ; if they have been frozen and thawed, the yield reaches 70 p. 100. Moreover, about 50 p. 100 of the total yield is realised in the beginning of the extraction at 0,1 kg/cm² pressure. This result points out that the extraction of juice can be facilitated after freezing and this technic can be used with pressing devices providing very low pressures.

A sample of apple strips has been freeze-dried, rehydrated to the same weight and pressed. The results are given also on the figure 2. The juice extraction pattern (4) is similar to that of a sample frozen and submitted to maceration after

thawing (3). So we can suppose that the deterioration of the cells facilitating release of the juice is realised during freezing and not during thawing.

In an other experiment (5), a non-frozen fine puree has been used. It appears that the juice yield is almost the same as in the case of frozen strips. But in the latter, the juice is clearer and less coloured and do not contain suspended particles. This is of interest to the juice manufacturing industry, where the turbidity of the juice leads to filtration difficulties, as the pulp particles occupy an appreciable volume of the sedimentation tank where the juice is treated.

Moreover, in the case of the juice obtained from pulp macerated 20 hours after thawing, the juice is less turbid and browning is less rapid. The loss of color may be assigned to the fact that the oxidized polyphenols are precipitated on the proteins and remain in the press-cake. The color of the cake is in fact darker after maceration of the pulp. Turbidity is due to the cell particles which are produced during finer grating. For this reason, the juice extracted from the fine puree is extremely turbid. During freezing of the strips, the cells are punctured by ice crystals and the cell sap is extracted without any contamination with cell particles. During pressing of the strips, the juice is filtred through a fibrous cake and the particles remain into the filter material. As a matter of fact, the turbidity of the juice goes down from the beginning to the end of pressing, as shown in the table 1. The decrease in optical density at 570 nm is due to the decrease of the color and the turbidy of the juice.

TABLE I

*Optical density of the fractions of juice extracted from apple strips submitted to different treatments*

*Densité optique des fractions de jus extraites de cossettes de pommes soumises à différents traitements*

| Force/unit surface of the pulp : kg/cm² | Non-frozen strips | Frozen strips extracted at 0°C | Frozen strips extracted after 20 hr maceration at 20°C | Non-frozen puree |
|---|---|---|---|---|
| 0.0 | — | — | 0.242 | 1.109 |
| 0.1 | — | 0.531 | 0.164 | 0.786 |
| 0.2 | — | 0.376 | 0.083 | 0.509 |
| 0.5 | 0.545 | 0.251 | 0.073 | 0.392 |
| 1.0 | 0.366 | 0.149 | 0.081 | 0.297 |
| 2.0 | 0.249 | 0.097 | 0.072 | 0.219 |
| 5.0 | 0.162 | 0.081 | 0.060 | 0.269 |

Optical density after à 4 fold dilution in water at 570 nm.
For the volumes of fractions, see fig. 2.

## *Composition of juice*

Composition of the juice changes during pressing. In order to have sufficient quantities of juice to perform the analysis, the six fractions have been grouped into three (I to III).

As it can be seen on the table 2, the sugar content does not vary very much. The juices extracted from the frozen-thawed apples are slightly more acid as compared to the juices obtained from non-frozen apples. The difference is more marked with the fresh fruit strips pressed before cold storage. This result agrees with that of MAIA and LUH (1970) who have observed the increase of acidity in freeze-dried and heated bananas.

TABLE 2

*Composition of the regrouped juice fractions obtained from non-frozen and frozen strips*

*Composition de fractions regroupées de jus obtenus à partir de cossettes non congelées et congelées*

| | November 1972 (just after picking) | | | | | | March 1973 (after 4 months cold storage at 4°C) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Non-frozen strips | | | Frozen strips | | | Non-frozen strips | | | Frozen strips | | |
| | I | II | III | I | II | III | I | II | III | I | II | III |
| Volume (ml) ...... | 78 | 102 | 163 | 418 | 128 | 172 | 80 | 100 | 165 | 300 | 220 | 190 |
| Titrable acidity (meq/l) .......... | 38.4 | 36.8 | 35.0 | 46.3 | 52.1 | 55.4 | 35.5 | 36.9 | 35.9 | 40.8 | 41.1 | 41.2 |
| Pectine expressed as anhydrogalacturonic acid (mg/l) ... | 1.34 | 1.62 | 1.35 | 1.43 | 1.54 | 1.07 | 0.95 | 1.05 | 1.25 | 1.60 | 1.21 | 0.86 |
| Apparent viscosity at 25°C (c. poises) | 6.1 | 6.9 | 8.2 | 8.9 | 10.5 | 5.5 | 5.9 | 6.4 | 8.8 | 14.2 | 8.1 | 4.1 |
| Total sugars expressed as sucrose (mg/l) ........... | 154 | 152 | 149 | 156 | 158 | 160 | — | — | — | — | — | — |
| Ashes (mg/l) ....... | — | — | — | — | — | — | 1.5 | 1.7 | 1.6 | 2.5 | 2.5 | 2.7 |
| Cations : (mg/l) | | | | | | | | | | | | |
| $Ca^{++}$ .......... | — | — | — | — | — | — | 449 | 405 | 338 | 321 | 265 | 435 |
| $Mg^{++}$ ......... | — | — | — | — | — | — | 45 | 46 | 45 | 44 | 40 | 44 |
| $K^{+}$ .......... | — | — | — | — | — | — | 332 | 475 | 332 | 2 135 | 1 584 | 1 866 |

The freezing increases the cation content of the juice. In the case of frozen apples, the K content of the juice is five fold that of the juice obtained from the non-frozen. The Mg content is constant and the Ca content increases in the last fraction of the extraction from the frozen apple strips and decreases regularly in the fractions obtained from the non-frozen strips.

The increase of K does not produce any diminution of titrable acidity. For this reason, we believe that K is linked to material solubilised by freezing. But as we do not have the data on the K distribution in the fruit tissues, we cannot locate this portion solubilised.

The juice obtained from the unfrozen apples contains less pectin in the beginning of the extraction and the pectin content increases during the extraction whereas in the case of the juice fractions extracted from frozen apple strips, the pectin

content decreases in the last fraction. This finding can be explained by the microscopic observations of NGUYEN (1969) who has shown that the ice cristals formation during freezing starts in the intracellular meatus and detaches the cell walls normally in contact. During thawing, the middle lamella is damaged and the pectins of this part are solubilised in the cell sap which passes through. We believe that the increase of 67 p. 100 pectin observed in the first fractions of juice from frozen apples is due to the pectins localised in the middle lamella.

The viscosity measurements show (fig. 3) that the juices extracted from unfrozen apples increase in their viscosity from the beginning to the end of the extraction. The contrary is observed in the case of frozen apples. The first fraction shows highest viscosity, even higher than the last fraction from the unfrozen apples. Juices viscosity cannot be related to their pectin content expressed as anhydrogalacturonic acid. The same behaviour is observed in both the experiments (nov. 1972-march 1973).

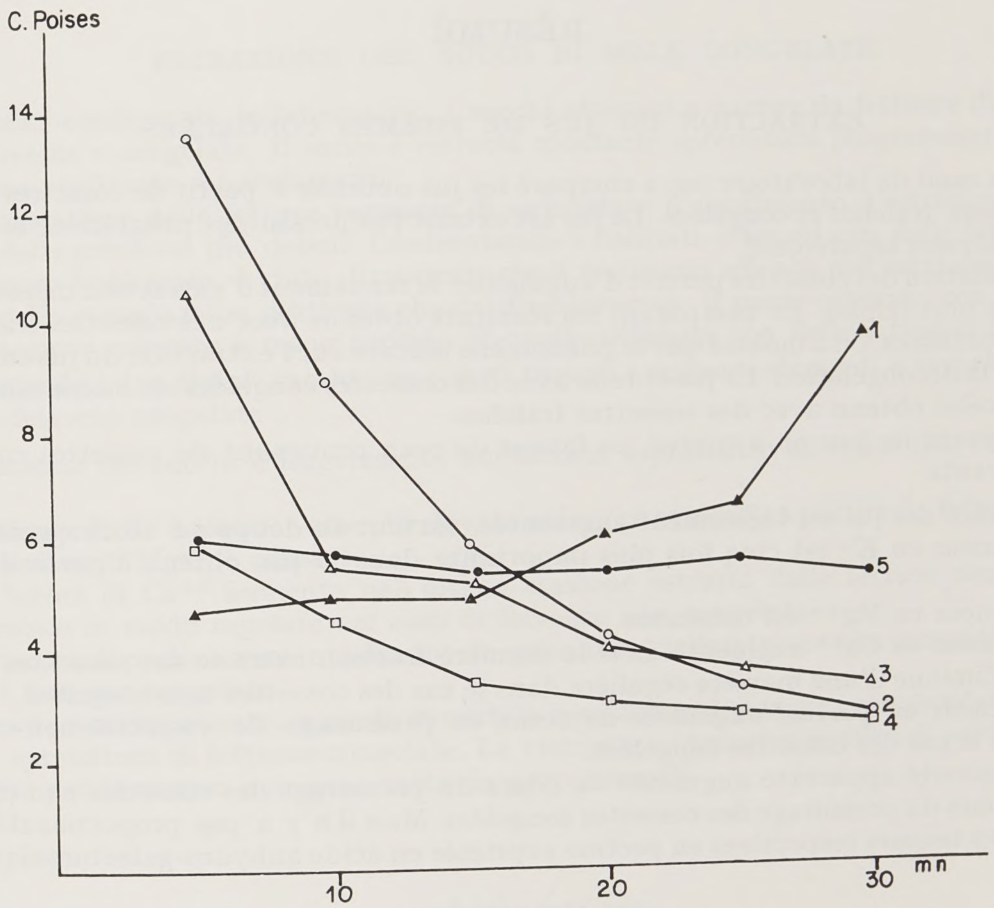



FIG. 3. — *Viscosity of the different fractions of juice* (for legend, see fig. 2)

*Viscosité des fractions de jus extraites* (cf. légende fig. 2)

In the case of puree, the variations of viscosities are much lower than those of the samples obtained from frozen strips, even though the yield is almost the same. This may be due to differences in the nature of these pectic substances.

The decrease of viscosity during pressing allows an easier extraction of the juice, because the most viscous juice flows through a loose pressing-cake and the less viscous flows through a compact cake.

## CONCLUSION

Freezing the apple strips or even fruits before pressing seems an advantageous method to aid juice extraction. The procedure is already used with such fruits as strawberries and raspberries which are normally delivered frozen in the factories. The present work shows that the same procedure can be successfully used with apples, because it facilitates juice extraction, giving juice of less colour and turbidity. An important problem detected during this work is the lack of knowledge concerning location and combination of K in the apples ; this will be discussed in an other report dealing with the properties of pectins.

*Reçu pour publication en décembre 1974.*


## RÉSUMÉ

### EXTRACTION DU JUS DE POMMES CONGELÉES

Dans un essai de laboratoire, on a comparé les jus obtenus à partir de cossettes de pommes *Golden delicious*, fraîches et congelées. Le jus est extrait par pressurage programmé et les diverses fractions analysées séparément.

La congélation des cossettes permet d'augmenter le rendement d'extraction même si on utilise des pressions plus faibles. En comparant les résultats obtenus avec des cossettes fraîches et des cossettes lyophilisées, on a montré que le phénomène efficace sur l'extraction du jus était la congélation et non la décongélation. Le jus obtenu avec des cossettes congelées est moins coloré et moins trouble que celui obtenu avec des cossettes fraîches.

En analysant les jus, on a trouvé, en faveur de ceux provenant de cossettes congelées, les résultats suivants.

1° L'acidité des jus est légèrement augmentée, surtout au début du stockage des pommes.

2° La teneur en $K^+$ est cinq fois plus importante dans le jus obtenu à partir de cossettes congelées.

3° La teneur en $Mg^{++}$ est constante.

4° La teneur en $Ca^{++}$ augmente dans la dernière fraction extraite des cossettes congelées, alors qu'elle diminue d'une manière régulière dans le cas des cossettes non-congelées.

5° La teneur en pectine augmente au cours de pressurage de cossettes non-congelées et diminue dans le cas des cossettes congelées.

6° La viscosité apparente augmente au cours du pressurage des cossettes non-congelées et diminue au cours du pressurage des cossettes congelées. Mais il n'y a pas proportionalité entre les viscosités et les teneurs respectives en pectine exprimée en acide anhydro-galacturonique.



## RESUMEN

### EXTRACCION DEL ZUMO DE MANZANAS CONGELADAS

Al proceder a un ensayo de laboratorio, se ha procedido a la comparación de los zumos obtenidos por medio de rodajas de manzanas *Golden delicious*, frescas y congeladas. El zumo es extraido por prensado programado y las diversas fracciones son analizadas por separado.

La congelación de las rodajaz permite conseguir un aumento del rendimiento de extracción, incluso si se aplican presiones más reducidas. Comparando los resultados obtenidos por medio de rodajas frescas y rodajas liofilizadas, ha podido demostrarse que el fenómeno eficaz sobre la extracción del zumo consistía en la congelación y no en la descongelación. Los zumos obtenidos por medio de rodajas congeladas son menos coloreados y menos turbios que los zumos obtenidos mediante rodajas frescas.

Al proceder al análisis de los zumos se ha encontrado, en favor de aquellos procedentes de rodajas congeladas, los resultados siguientes :

1º La acidez de los zumos queda ligeramente aumentada, sobre todo al principio del almacenamiento de las manzanas.

2º El contenido en $K^+$ es cinco veces más importante en el zumo obtenido mediante rodajas congeladas.

3º El contenido de $Mg^{++}$ es constante.

4º El contenido de $Ca^{++}$ aumenta en la última fracción extraida de las rodajas congeladas, mientras que en el caso de las rodajas no congeladas disminuye de forma regular.

5º El contenido de pectina aumenta durante el transcurso del prensado de las rodajas sin congelar, y, por el contrario, disminuye en el caso de las rodajas congeladas.

6º La viscosidad aparente aumenta durante el transcurso del prensado de las rodajas sin congelar y disminuye, por el contrario, cuando se trata de las rodajas congeladas. Pero, en cambio, no existe propocionalidad entre las viscosidades y los contenidos respectivos de pectina expresada en ácido anhidrogalanturónico.

## RIASSUNTO

### ESTRAZIONE DEL SUCCO DI MELE CONGELATE

Sono stati confrontati, in laboratorio, i succhi ottenuti a partire da fettucce di mele *Golden delicious*, fresche e congelate. Il succo è estratto mediante spremitura programmata e le diverse frazioni sono analizzate separatamente.

La congelazione delle fettuce permette di aumentare il rendimento d'estrazione anche se si utilizzano delle pressioni più deboli. Confrontando i risultati ottenuti con delle fettucce fresche e delle fettucce liofilizzate, è stato dimostrato che il fenomeno efficace nell'estrazione del succo è costituito dalla congelazoine piùttosto che dal disgelamento. Il succo ottenuto con delle fettucce congelate è meno colorato e meno torbido di quello ottenuto con delle fettucce fresche.

Analizzando i due tipi di succhi, sono stati trovati i seguenti elementi a favore di quelli provenieni da fettucce congelate :

1º L'acidità dei succhi è leggermente aumentata soprattutto all'inizio dell stoccaggio delle mele.

2º Il tenore di $K^+$ è cinque volte più elevato nel succo ottenuto a partire da fettucce congelate.

3º Il tenore di $Mg^{++}$ è costante.

4º Il tenore di $Ca^{++}$ aumenta nell'ultima frazione estratta dalle fettuce congelate mentre esso diminuisce in modo regolare nel caso di fettucce non congelate.

5º Il tenore di pectina aumenta durante la spremitura delle fettucce non congelate e diminuisce nel caso di fettucce congelate.

6º La viscosità apparente aumenta durante la spremitura di fettuce non congelate e diminuisce durante la spremitura di fettucce congelate. Le viscosità e i tenori rispettivi di pectina espressi in acido anidro-galatturonico non sono tuttavia proporzionali.

## RÉFÉRENCES

CUENIN E., 1972. Effets de la congélation sur quelques caractères physico-chimiques de purées de fruits et du jus de framboises. *C. R. Acad. Agric.*, **58**, 1530-1534.

GUIMBERTEAU G., 1960. Application de l'anthrone au dosage des sucres fermentescibles du vin. *Ann. Technol. agric.*, (1), 67-78.

DE BRUYN J. W., VAN KEULEN H. A., FERGUSON J. H. A., 1968. Rapid method for the simultaneous determinations of glucose and fructose using anthrone reagent. *J. Sci. Food Agric.*, **19**, (oct.), 597-601.

MCCOMB, MCCREADY R. H., 1952. Colorimetric determination of pectic substances. *Anal. Chem.*, **24**, 1630-1632.

BELTMAN H., PILNIK W., DEVOS L., 1971. The Kramer shear press as a laboratory pressing device and results of experiments with apples. *Confructa*, **16** (1), 4-9.

MAIA G. A., LUH B. S., 1970. Storage stability and quality of freeze dried bananas. *Confructa*, **15** (4), 216-230.

NGUYEN VINH XUAN, 1969. Localisation et aspect de la glace dans l'épiderme d'oignon, dans différentes conditions de refroidissement. *Revue génér. Froid*, (1), 89-99.

*Ann. Technol. agric.*, 1975, **24** (1), 11-23.

# ÉTUVAGE DU RIZ. INFLUENCE DES CONDITIONS DE TRAITEMENTS ET DES FACTEURS VARIÉTAUX SUR LES CARACTÉRISTIQUES DES PRODUITS FINIS

P. FEILLET et R. ALARY

*Laboratoire de Technologie des Blés durs et du Riz,*
*34060 Montpellier Cedex*

## RÉSUMÉ

On a étudié l'influence des conditions d'étuvage du riz sur la qualité des produits finis à l'aide d'une installation de laboratoire entièrement automatique. La durée de trempage (10 ou 30 mn) a peu d'influence tandis qu'une faible augmentation de la température (65° à 75°C) a pour effet de diminuer la fermeté du riz après appertisation ; des changements dans la durée de l'injection de vapeur (10, 20 ou 30 mn) et dans la température de celle-ci (105, 112 ou 120°C) se traduisent par des effets beaucoup plus marqués sur l'ensemble des paramètres étudiés : rendement à l'usinage ; aspect, jaunissement et taux de gélatinisation du riz étuvé ; qualité culinaire et aptitude à l'appertisation. Une liaison hautement significative entre le jaunissement et la fermeté après cuisson des riz étuvés a été mise en évidence. Des 8 variétés françaises étudiées, *Arlésienne* possède la meilleure qualité.

Mots clés : *riz, traitement, étuvage, usinage, appertisation, qualité culinaire.*

## I. — INTRODUCTION

L'étuvage du riz, traditionnellement pratiqué aux Indes et plus récemment dans les pays industrialisés, consiste en un traitement hydrothermique du riz paddy qui provoque simultanément la gélatinisation de l'amidon, la désintégration des corpuscules protéiques de l'albumen et une migration des matières minérales et des vitamines hydrosolubles vers l'intérieur du grain. Il a pour effet d'accroître le rendement à l'usinage, d'améliorer la valeur nutritionnelle et de modifier les propriétés organoleptiques des produits cuits (ANGLADETTE, 1966 ; GARIBOLDI, 1972).

Les modifications subies par l'amidon et les protéines provoquent une transformation profonde de la structure physicochimique de l'albumen, conférant une meil-

leure cohésion au grain. De ce fait, les riz étuvés sont largement utilisés pour la consommation directe ou par les industries de deuxième transformation (plats cuisinés, soupes en conserves...). Par contre le jaunissement et le « goût de son » qui se développent au cours de l'étuvage sont le plus souvent mal acceptés par les utilisateurs.

L'intensité des modifications dépend des conditions de traitement qui provoquent une gélatinisation partielle (procédé Avorio) ou totale (procédé « converted ») de l'amidon (Borasio et Gariboldi, 1965). Des études diverses font état de l'influence de la durée de trempage ou de la pression d'étuvage sur la coloration (Roberts *et al.*, 1954 ; Jayanarayanan, 1965 ; Johnson, 1965 ; Dimopoulos et Muller, 1972), la qualité culinaire (Roberts *et al.*, 1954 ; Bhattacharya et Subba Rao, 1966 ; Subrahmanyan, 1971 ; Dimopoulos et Muller, 1972) et le comportement après appertisation des riz usinés (Demont, 1968).

Néanmoins, et eu égard à l'absence d'étude systématique, le présent travail a été entrepris pour préciser les effets des conditions d'étuvage des variétés de riz françaises sur la valeur d'utilisation des produits obtenus.

## II. — MATÉRIEL ET MÉTHODES

### *Matériel*

L'étude a porté sur 8 variétés de riz en provenance de la rizière expérimentale de l'I. N. R. A. au Mas d'Adrien. Leur teneur en amylose, déterminée par la méthode de Juliano (1971), est comprise entre 23,4 et 28,5 p. 100 matières sèches (MS) (Amylose de référence : Amylose Merck n° 4561).

| | *Delta* | *Césariot* | *Cigalon* | *Cristal* |
|---|---|---|---|---|
| Amylose p. 100 MS...... | 23,4 | 23,6 | 24,6 | 25,5 |
| Type de grain........... | Long | Long | Court | Court |

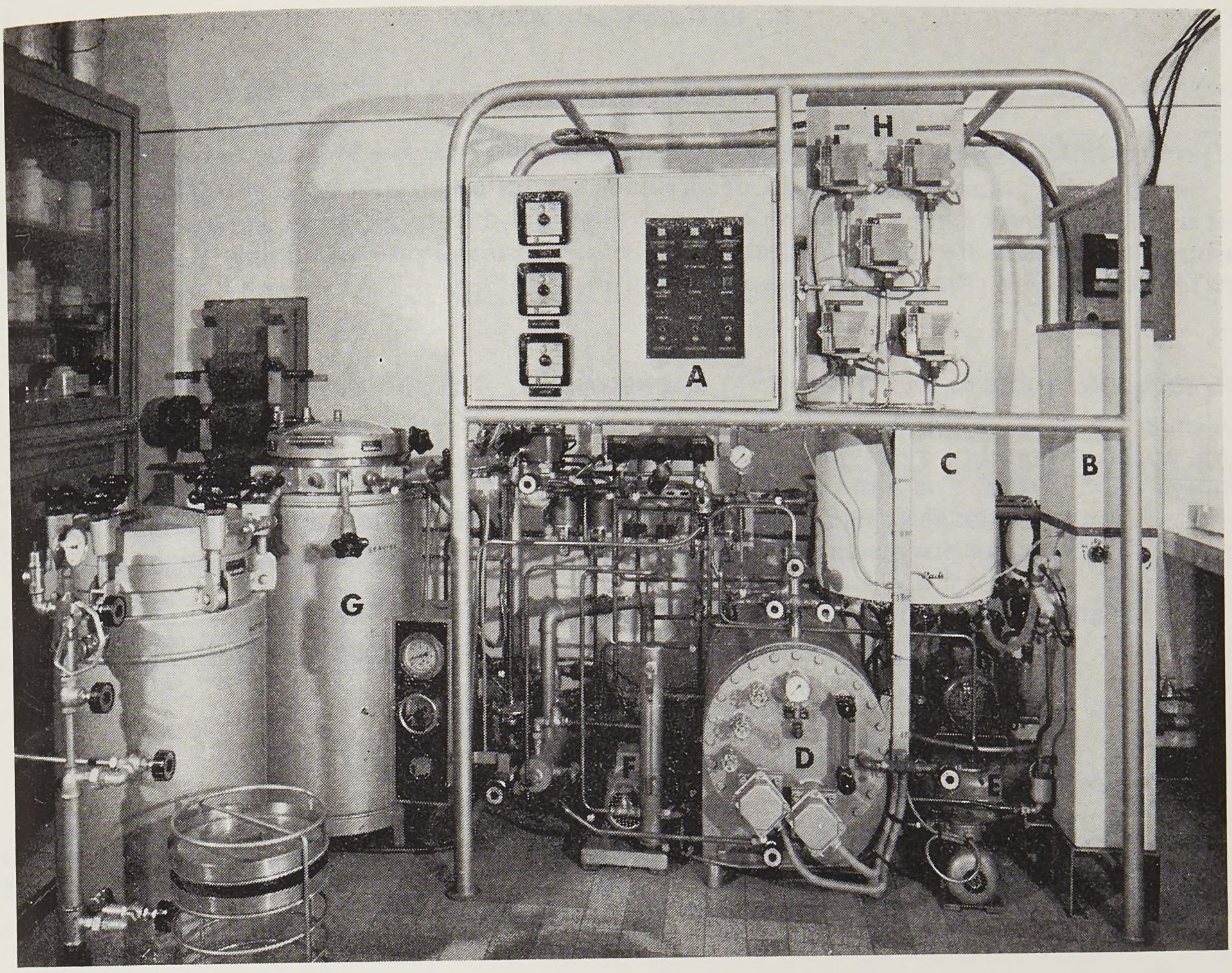
| | *Balilla* | *Euribé* | *Césariot* β0 | *Arlésienne* |
|---|---|---|---|---|
| Amylose p. 100 MS...... | 25,5 | 26,4 | 27,0 | 28,5 |
| Type de grain........... | Court | Moyen | Long | Moyen |

Après récolte, les riz paddy ont été placés dans une pièce conditionnée à 16-18°C et 72-75 p. 100 d'humidité relative de manière que leur teneur en eau se stabilise vers 15 p. 100 matière humide (MH) au bout de 3 semaines (Feillet et Redon, 1971).

### *Étuvage*

L'appareillage utilisé (fig. 1), construit sur nos indications par les Éts Lequeux, est dérivé d'un prototype décrit par Webb et Adair (1970). Il comprend un adoucisseur d'eau (B), un chauffe-eau (C), un générateur de vapeur (D), un compresseur (E), une pompe à vide (F) et une chambre de traitement (G). Grâce au tableau de commande (A) auquel sont reliés des régulateurs de température et de pression (H), il est possible de fixer à l'avance les conditions de traitement des échantillons placés dans la chambre G (pression du vide ; pression, température et durée du trempage ; température et durée de l'étuvage). Le cycle du traitement se déroule automatiquement.

Les conditions standards d'étuvage, dont on s'est écarté dans ce travail en ne modifiant qu'une variable à la fois, sont voisines de celles retenues par l'industrie : le riz paddy est placé dans la chambre de traitement ; après l'avoir soumis 10 mn à un vide de 1 bar, on effectue un trempage de 30 mn à 65°C sous 3,1 bars ; l'étuvage proprement dit dure alors 20 mn à 112°C. Le riz étuvé est ensuite séché dans des conditions identiques à celles utilisées pour le séchage du riz paddy après récolte.



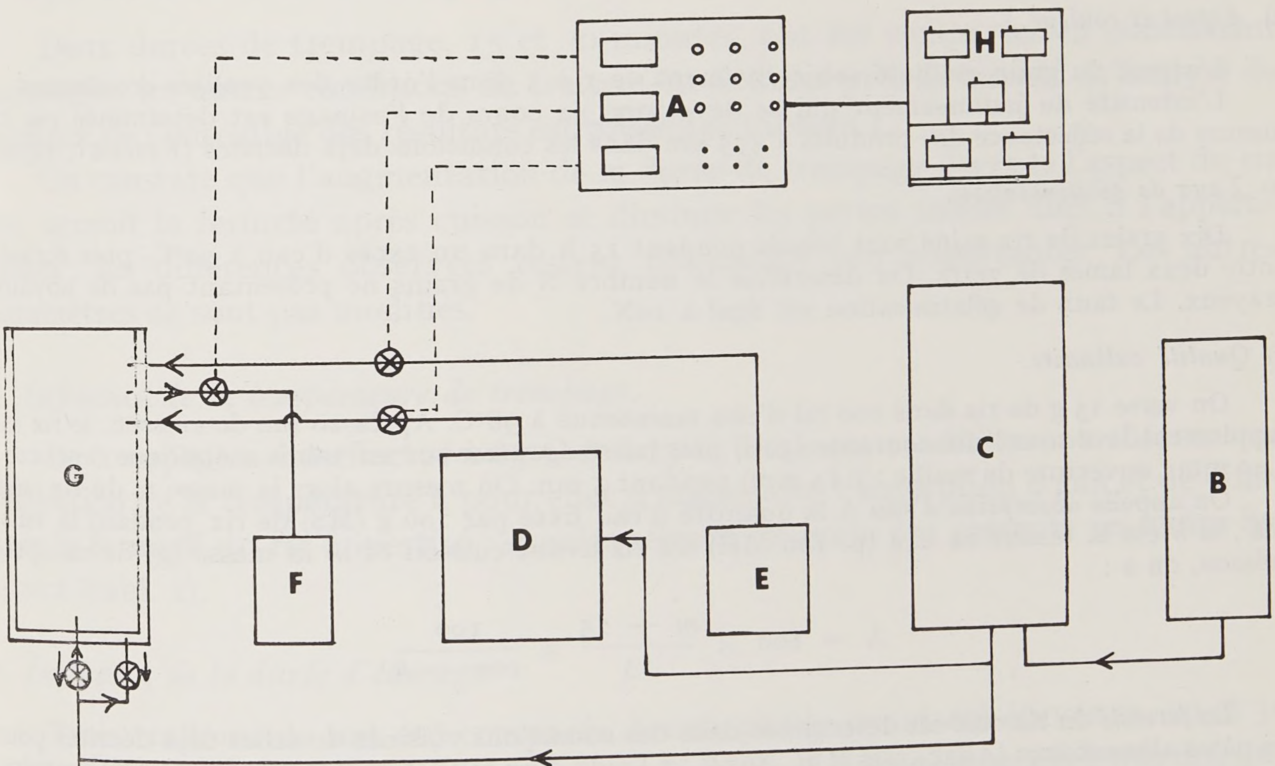




FIG. 1. — *Installation expérimentale d'étuvage du riz*

A : Tableau de commande
B : Adoucisseur d'eau
C : Chauffe-eau
D : Générateur de vapeur
E : Compresseur
F : Pompe à vide
G : Chambre de traitement
H : Régulateurs de température et de pression

*Usinage*

Soixante-dix grammes de riz sont décortiqués sur un appareil à rouleau Olmia puis blanchis dans une microrizerie à cône Universale. Étant donné la dureté du grain après étuvage, la durée d'usinage est supérieure de 15 secondes à celle déterminée précédemment pour chacune des variétés non traitées (FEILLET et REDON, 1971).

*Appertisation*

L'appertisation du riz étuvé et usiné est effectuée dans des conditions voisines de celles de WEBB et ADAIR (1971) : on ajoute 110 ml d'eau à 82°C à 11 g de riz placés dans une boîte format 1/6 basse ; après sertissage et agitation pendant 3 minutes, le riz est stérilisé 20 mn à 120°C ; la purge de vapeur et le refroidissement qui font suite durent chacun 5 mn ; la valeur stérilisatrice du traitement est égale à 4,4 (LONCIN, 1961).

Avant l'analyse, les boîtes sont stockées 1 mois à 19°C.

*Appréciation de la qualité du riz*

1. *Rendement à l'usinage.*

Après usinage, les grains entiers sont séparés des brisures par triage manuel puis pesés. On appelle rendement à l'usinage le rapport entre le poids de riz blanchi entier et le poids de riz paddy décortiqué (riz cargo). La détermination est faite en double et on calcule la valeur moyenne.

2. *État physique du riz usiné.*

a) *Aspect et couleur.*

L'aspect du grain est noté subjectivement de 1 à 5 dans l'ordre des qualités croissantes.

L'intensité du jaunissement qui se développe au cours de l'usinage est déterminée par la mesure de la réflectance des produits à 475 nm dans les conditions déjà décrites (FEILLET, 1970).

b) *Taux de gélatinisation.*

Dix grains de riz usiné sont laissés pendant 15 h dans un excès d'eau à 50°C, puis écrasés entre deux lames de verre. On détermine le nombre N de grains ne présentant pas de noyaux crayeux. Le taux de gélatinisation est égal à 10N.

c) *Qualité culinaire.*

On verse 15 g de riz dans 100 ml d'eau maintenue à 98°C. Après 20 mn de cuisson, le riz est rapidement lavé sous l'eau courante (30 s) puis laissé égoutter sur un tamis métallique (entraxe : 1,40 mm ; ouverture de maille : 1,15 mm) pendant 5 mn. On mesure alors la masse $m$ du riz cuit.

On appelle *absorption d'eau* A la quantité d'eau fixée par 100 g (MS) de riz pendant la cuisson ; si $h$ est la teneur en eau (p. 100 MH) du riz avant cuisson et $m$ la masse (g) de riz après cuisson, on a :

$$A = 100 \times \frac{m - 15}{15} \times \frac{100}{100 - h}$$

La *fermeté* du riz cuit est déterminée dans des conditions voisines de celles déjà décrites pour les pâtes alimentaires (ABECASSIS *et al.*, 1974) : à l'aide d'un consistomètre construit au laboratoire, on détermine la force moyenne qui doit être appliquée sur un piston de manière à extruder à travers une grille métallique (mailles carrées ; entraxe : 2,55 mm ; ouverture de maille : 1,95 mm) 13 g de riz cuit placé dans une cellule conçue à cet effet ($\varnothing$ = 16,4 mm ; $h$ = 43,9 mm). Les résultats sont exprimés en gramme force.

d) *Comportement à l'appertisation.*

*L'absorption d'eau* et la *fermeté* du riz après appertisation sont déterminées comme ci-dessus (§ 2 *c*).

On appelle *pertes solides* la quantité de matières présentes dans le liquide de cuisson après égouttage sur le tamis métallique décrit ci-dessus. Celles-ci sont déterminées après évaporation des

eaux d'égouttage à 102°C pendant 4 heures. Les résultats sont exprimés en g de produit sec pour 100 g de riz appertisé (MS).

*L'aspect du grain* est noté subjectivement de 1 à 5 dans l'ordre des qualités croissantes.

## III. — RÉSULTATS ET DISCUSSIONS

On a soumis 8 variétés de riz à 7 traitements d'étuvage ; les produits obtenus ont été caractérisés par 10 paramètres distincts : rendement à l'usinage ; aspect, jaunissement et taux de gélatinisation du riz blanchi ; absorption et fermeté du riz cuit ; aspect, absorption d'eau, fermeté et pertes solides du riz appertisé.

Les 560 analyses effectuées ont été regroupées de manière à faire ressortir l'incidence des conditions de traitement, les relations existants entre les paramètres analysés, l'influence variétale sur les caractéristiques des riz étuvés.

### A. — *Influence des conditions de traitement*

On a étudié successivement l'influence de la durée et de la température de trempage, puis de la durée et de la température d'étuvage sur le rendement à l'usinage du riz paddy et les propriétés du riz blanchi.

#### 1. *Influence de la durée de trempage.*

Deux durées de trempage, 15 et 30 minutes, ont été comparées en maintenant inchangées les autres conditions de traitement définies précédemment. L'analyse de variance de l'ensemble des résultats est présentée tableau 1.

On constate que l'augmentation de la durée de trempage dégrade l'aspect du riz cru, accroît la fermeté après cuisson et diminue les pertes solides dues à l'appertisation ; les différences observées restent néanmoins peu importantes. Les autres paramètres ne sont pas modifiés.

#### 2. *Influence de la température de trempage.*

Le trempage a été effectué à 65°C et à 75°C. Dans ces conditions, on observe que l'élévation de la température a pour effet d'augmenter l'absorption d'eau et de diminuer la fermeté du riz appertisé ; simultanément, le grain cru présente un moins bel aspect (tabl. 2).

#### 3. *Influence de la durée d'étuvage.*

Trois traitements ont été comparés, les riz *paddy* ayant été étuvés 10, 20 et 30 minutes. L'analyse de variance montre que la durée d'étuvage a un effet très marqué sur les caractéristiques des produits obtenus (tabl. 3).

La prolongation de l'étuvage se traduit de la manière suivante :

- — diminution du rendement à l'usinage après 30 minutes de traitement ;
- — dégradation de l'aspect et de la couleur du riz blanchi ;
- — accroissement du taux de gélatinisation ;
- — augmentation puis diminution de la fermeté du riz cuit ; effet inverse sur l'absorption d'eau ;

TABLEAU 1. — *Influence de la durée de trempage* (15 et 30 minutes) *sur les caractéristiques du riz étuvé*

Moyenne des résultats sur 8 variétés

| | Rendement à l'usinage | État physique des grains | | | Qualité culinaire | | Comportement à l'appertisation | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Aspect | Jaunissement | Taux de gélatinisation | Absorption d'eau | Fermeté | Aspect | Absorption d'eau | Fermeté | Pertes solides |
| Durée de trempage (mn) | | | | | | | | | | |
| 15 | 83,5 | 3,8 | 0,360 | 6,2 | 317 | 4 460 | 2,8 | 499 | 710 | 8,6 |
| 30 | 82,3 | 3,3 | 0,363 | 7,0 | 315 | 4 910 | 3,1 | 504 | 780 | 7,9 |
| Valeurs de F (analyse de variance) | | | | | | | | | | |
| Effet Variété | 4,8* | 3,0 | 7,0* | 2,4 | 7,0** | 24,2** | 2,0 | 35,2** | 36,9** | 8,3** |
| Effet Traitement | 2,2 | 8,8* | 0,3 | 0,3 | 0,4 | 12,1* | 1,1 | 0 | 4,4 | 18,8** |

TABLEAU 2. — *Influence de la température de trempage* (65° et 75°C) *sur les caractéristiques du riz étuvé*

Moyenne des résultats sur 8 variétés

| | Rendement à l'usinage | État physique des grains | | | Qualité culinaire | | Comportement à l'appertisation | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Aspect | Jaunissement | Taux de gélatinisation | Absorption d'eau | Fermeté | Aspect | Absorption d'eau | Fermeté | Pertes solides |
| Température de trempage (°C) | | | | | | | | | | |
| 65 | 82,3 | 3,3 | 0,363 | 7,0 | 315 | 4 910 | 3,1 | 504 | 780 | 7,9 |
| 75 | 82,3 | 3,1 | 0,374 | 7,8 | 316 | 4 400 | 3,0 | 560 | 647 | 9,0 |
| Valeur de F (analyse de variance) | | | | | | | | | | |
| Effet Variété | 16,8* | 13,8* | 4,6* | 5,8* | 3,9* | 8,4** | 4,4* | 6,1* | 19,7** | 2,5 |
| Effet Traitement | 0 | 7,0* | 3,7 | 5,5 | 0,0 | 4,4 | 1,0 | 15,8** | 8,8* | 4,5 |

TABLEAU 3. — *Influence de la durée d'étuvage* (10, 20 et 30 minutes) *sur les caractéristiques du riz étuvé*
Moyenne des résultats sur 8 variétés

| | Rendement à l'usinage | État physique des grains | | | Qualité culinaire | | Comportement à l'appertisation | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Aspect | Jaunis-sement | Taux de gélatini-sation | Absorption d'eau | Fermeté | Aspect | Absorption d'eau | Fermeté | Pertes solides |
| Durée d'étuvage (mn) | | | | | | | | | | |
| 10 | 82,4 | 4,1 | 0,325 | 0,0 | 327 | 3 980 | 2,1 | 606 | 429 | 10,3 |
| 20 | 82,3 | 3,3 | 0,363 | 7,0 | 315 | 4 910 | 3,1 | 504 | 780 | 7,9 |
| 30 | 76,9 | 2,8 | 0,425 | 9,9 | 326 | 4 390 | 3,2 | 545 | 878 | 8,1 |
| Valeur de F (analyse de variance) | | | | | | | | | | |
| Effet Variété | 27,4* | 19,9** | 4,9** | 2,3 | 5,4** | 6,5** | 1,7 | 4,7** | 5,6** | 0,9 |
| Effet Traitement | 80,0** | 133,0** | 97,6** | 127,9** | 4,2* | 7,5** | 7,4** | 11,3** | 7,8** | 2,1 |

TABLEAU 4. — *Influence de la température d'étuvage* (105°, 112° et 120°C) *sur les caractéristiques du riz étuvé*
Moyenne des résultats sur 8 variétés

| | Rendement à l'usinage | État physique des grains | | | Qualité culinaire | | Comportement à l'appertisation | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Aspect | Jaunis-sement | Taux de gélatini-sation | Absorption d'eau | Fermeté | Aspect | Absorption d'eau | Fermeté | Pertes solides |
| Température d'étuvage (°C) | | | | | | | | | | |
| 105 | 81,7 | 3,4 | 0,347 | 1,6 | 339 | 3 560 | 2,4 | 512 | 530 | 8,2 |
| 112 | 82,3 | 3,3 | 0,363 | 7,0 | 315 | 4 910 | 3,1 | 504 | 780 | 7,9 |
| 120 | 78,5 | 2,3 | 0,430 | 8,0 | 314 | 4 980 | 2,9 | 532 | 920 | 7,8 |
| Valeur de F (analyse de variance) | | | | | | | | | | |
| Effet Variété | 15,2** | 15,6** | 9,0** | 1,4 | 3,6* | 9,2** | 2,0 | 14,4** | 20,7** | 1,2 |
| Effet Traitement | 22,2** | 102,2** | 119,6** | 37,4** | 13,2** | 24,8** | 4,2* | 3,1 | 25,3** | 0,9 |

* Seuil de probabilité 95 p. 100; ** Seuil de probabilité 99 p. 100.

— amélioration de l'aspect du riz appertisé ;
— accroissement de la fermeté du riz appertisé ; diminution puis augmentation de l'absorption d'eau.

4. *Influence de la température d'étuvage.*

Le riz a été traité à 105, 112 et 120°C. Les résultats rapportés tableau 4 montrent que l'accroissement de la température a un effet comparable à l'augmentation de la durée d'étuvage.

Un traitement excessif a pour effet d'abaisser la valeur du rendement à l'usinage et d'affecter la couleur et l'aspect des produits obtenus. On constate également un accroissement parallèle du degré de gélatinisation et de la fermeté du riz cuit ou appertisé.

### B. — *Relations entre les composantes de la qualité*

La matrice des coefficients de corrélation donnée tableau 5 et le dendrogramme (Ducimetiere, 1970) qui en dérive (fig. 2) mettent en évidence de nombreuses liaisons entre les 10 paramètres étudiés.

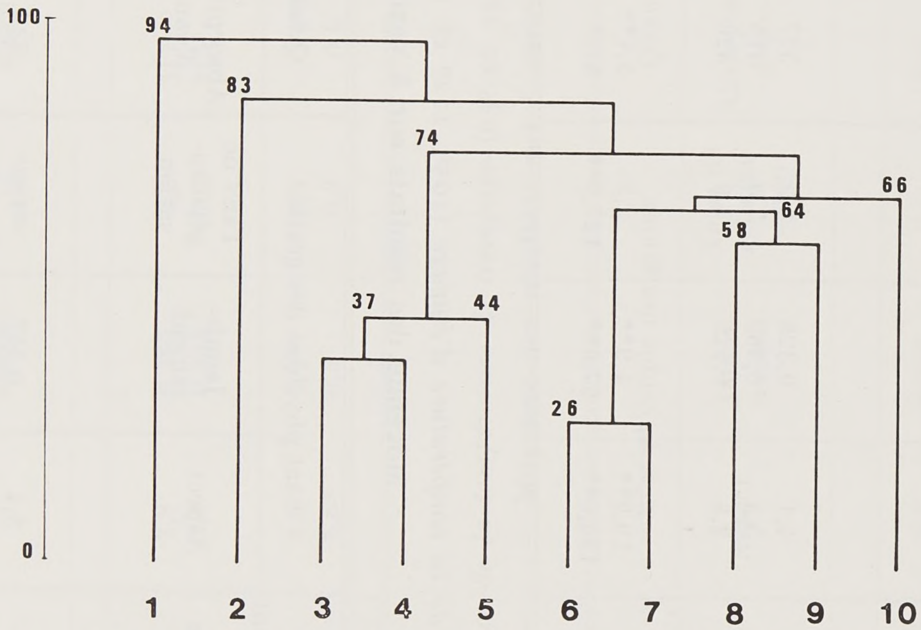



Fig. 2. — *Classification hiérarchique des différents paramètres analysés établie suivant la méthode de* single-linkage : *deux paramètres sont d'autant plus liés qu'ils se rejoignent à un niveau plus bas*

1 : Pertes solides du riz étuvé appertisé
2 : Rendement à l'usinage
3 : Jaunissement du riz étuvé
4 : Aspect du grain étuvé
5 : Taux de gélatinisation
6 : Absorption d'eau après cuisson du riz étuvé
7 : Fermeté après cuisson du riz étuvé
8 : Absorption d'eau après appertisation du riz étuvé
9 : Fermeté après appertisation du riz étuvé
10 : Aspect du grain étuvé appertisé

L'examen du tableau 5 conduit aux observations suivantes :

— l'absorption d'eau et la fermeté après cuisson du riz étuvé sont respectivement positivement corrélées à l'absorption d'eau et à la fermeté du riz appertisé ;
— la fermeté et l'aspect du riz appertisé sont positivement corrélés aux taux

TABLEAU 5

*Coefficients de corrélation entre les caractéristiques des riz étuvés* (56 degrés de liberté)

Seules les valeurs significatives au seuil de probabilités de 95* et 99** p. 100 ont été portées

| | Rendement à l'usinage | État physique des grains | | | Qualité culinaire | | Comportement à l'appertisation | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | Aspect | Jaunissement | Taux de gélatinisation | Absorption d'eau | Fermeté | Aspect | Absorption d'eau | Fermeté | Pertes solides |
| Rendement à l'usinage ...... | 1 000 | 0,409** | — 0,303* | — 0,345* | — 0,334* | — | — | — 0,406* | — | — |
| *État physique des grains* | | | | | | | | | | |
| Aspect ................ | | 1,000 | — 0,796** | — 0,713** | — | — | — | — | — | — |
| Jaunissement .......... | | | 1,000 | 0,748** | — | 0,325* | 0,287* | — | 0,510** | — |
| Taux de gélatinisation .. | | | | 1,000 | — | 0,373* | 0,360** | — | 0,346* | — |
| *Qualité culinaire* | | | | | | | | | | |
| Absorption d'eau ....... | | | | | 1,000 | — 0,860** | — 0,547** | 0,529** | — 0,464** | — |
| Fermeté .............. | | | | | | 1,000 | 0,534** | — 0,583** | 0,596** | — |
| *Comportement à l'appertisation* | | | | | | | | | | |
| Aspect ................ | | | | | | | 1,000 | — 0,581** | 0,527** | — |
| Absorption d'eau ....... | | | | | | | | 1,000 | — 0,648** | — |
| Fermeté .............. | | | | | | | | | 1,000 | — 0,325* |
| Pertes solides .......... | | | | | | | | | | 1,000 |

de gélatinisation auquel ne semble par contre pas relié le degré d'absorption d'eau ;

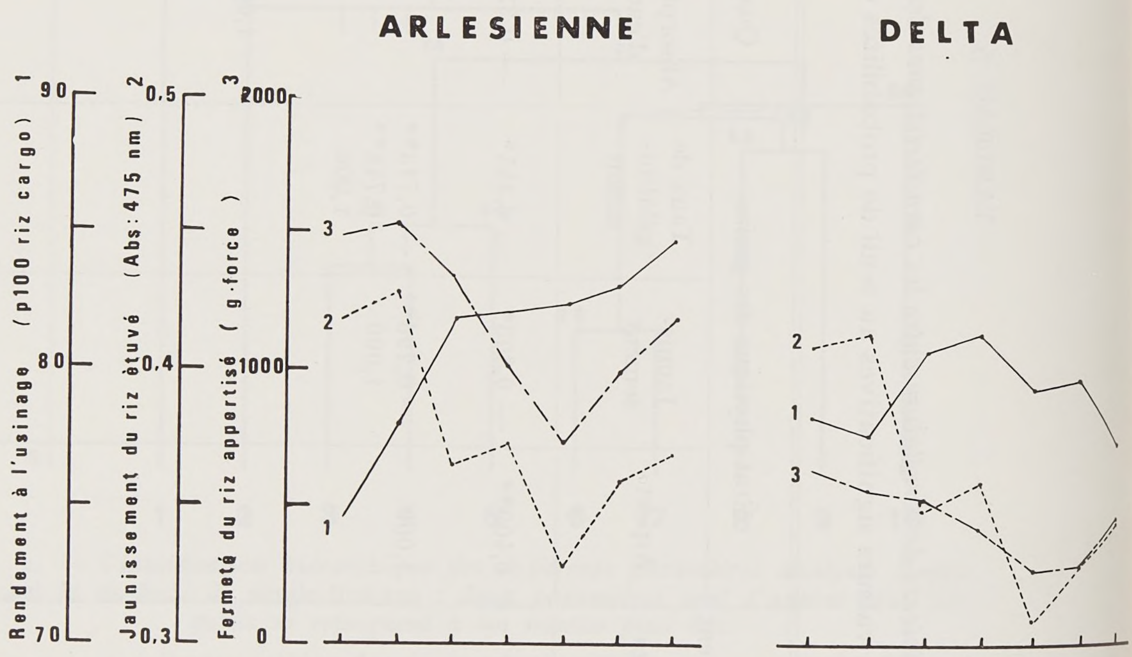
— il existe une corrélation négative entre fermeté et absorption d'eau aussi bien dans le cas du riz cuit que du riz appertisé ;

— l'intensification du jaunissement est positivement corrélée à l'accroissement de la fermeté, à l'amélioration de l'aspect du riz appertisé et au taux de gélatinisation du riz cru.

## C. — *Influence variétale*

Les résultats des analyses de variance présentés tableaux 1 à 4 montrent que les différences observées entre les caractéristiques des riz étuvés sont dues, pour une grande part, à la diversité des riz étudiés. Quel que soit le traitement, cette influence se fait particulièrement sentir sur le rendement à l'usinage, le jaunissement, la fermeté et l'absorption d'eau du riz cuit ou appertisé.

La comparaison détaillée du comportement des riz *Arlésienne* et *Delta*, choisis à titre d'exemple en raison de leur teneur extrême en amylose, dont on sait qu'elle influence la qualité du riz (JULIANO, 1972), fait ressortir des différences importantes entre ces deux échantillons. Celles-ci sont illustrées par la figure 3 qui représente l'évolution du rendement à l'usinage, du jaunissement du riz usiné et de la fermeté du riz cuit en fonction des traitements ; ces derniers ont été classés dans l'ordre du rendement à l'usinage croissant de la variété *Arlésienne*.




| | | | Arlésienne | | | | | | | Delta | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| **TREMPAGE** | Durée | ( mn ) | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 15 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 15 |
| | Température | ( °C ) | 65 | 65 | 65 | 75 | 65 | 65 | 65 | 65 | 65 | 65 | 75 | 65 | 65 | 65 |
| **ETUVAGE** | Durée | ( mn ) | 30 | 20 | 20 | 20 | 10 | 20 | 20 | 30 | 20 | 20 | 20 | 10 | 20 | 20 |
| | Température | ( °C ) | 112 | 120 | 112 | 112 | 112 | 105 | 112 | 112 | 120 | 112 | 112 | 112 | 105 | 112 |

FIG. 3. — *Influence des conditions d'étuvage sur quelques caractéristiques des variétés de riz* Arlésienne *et* Delta

Le rendement à l'usinage d'*Arlésienne*, plus sensible aux conditions d'étuvage que celui de *Delta* qui demeure sensiblement constant, atteint sa valeur maximale pour des conditions de traitement qui ne sont pas optimales dans le cas de *Delta*. L'évolution du jaunissement et de la fermeté des deux variétés est similaire, la fermeté étant néanmoins systématiquement plus élevée dans le cas d'*Arlésienne*. De ces résul-

tats, il semblerait que la variété *Arlésienne* soit plus apte à l'étuvage que *Delta*. Une étude sur plusieurs années serait néanmoins nécessaire avant de conclure avec certitude à la supériorité d'*Arlésienne*.

Soulignons enfin qu'une analyse en composantes principales de l'ensemble des résultats semble indiquer que les 8 variétés étudiées peuvent se classer en 3 familles : *Cristal, Cigalon* et *Euribé* ; *Césariot, Balilla, Césariot* βθ et *Arlésienne* ; *Delta*.

## IV. — CONCLUSION

L'appréciation de la qualité du riz paddy repose sur l'évaluation du rendement à l'usinage, qui doit être aussi élevé que possible, et sur la détermination des caractéristiques organoleptiques du riz usiné, avant et après cuisson. Celles-ci, qui intègrent les notions de goût, d'odeur, de fermeté et de couleur, sont jugées différemment suivant les pays et la nature des préparations dans lesquelles entre le riz. En France, et dans le cas le plus fréquent, où le riz est consommé en tant que « légume », le consommateur recherche un produit ferme, blanc et sans odeur ou goût étranger, de son en particulier.

La présente étude montre que le choix des conditions d'étuvage et la nature des variétés utilisées permettent de faire varier dans de très larges limites les propriétés des riz ainsi traités et de répondre aux exigences des utilisateurs, que ce soit pour la consommation directe ou après appertisation.

Ce travail confirme l'effet de l'étuvage sur le rendement à l'usinage ; à traitement identique, les variétés *Balilla, Césariot* βθ et *Arlésienne* donnent les meilleurs résultats. A rendement à l'usinage comparable, *Arlésienne* reste beaucoup plus ferme que *Delta* après appertisation tout en conservant une couleur identique.

Le développement du jaunissement est très sensible à l'intensité du traitement hydrothermique subi par le riz en cours d'étuvage, l'injection de vapeur à 120°C pendant 30 minutes produisant le maximum de modification. Certaines variétés, telles *Balilla* et *Cristal,* présentent une tendance plus marquée au jaunissement.

Compte tenu de la liaison significative existant entre jaunissement et fermeté, il ne semble pas exister de traitement permettant de rassembler sur le même échantillon une bonne qualité culinaire ou une bonne tenue à l'appertisation et une blancheur optimale. Il faudra donc réaliser un compromis de manière à répondre aux mieux aux besoins des utilisateurs et choisir les variétés les plus adaptées à l'obtention des produits finis recherchés. Il ressort de l'ensemble des résultats rapportés dans ce travail que le riz *Arlésienne* est, parmi les riz cultivés en France, le plus apte à l'étuvage et à l'appertisation ; il est donc regrettable que cette variété soit en voie de disparition.

*Reçu pour publication en décembre 1974.*

## REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé avec l'aide de la Délégation générale à la Recherche scientifique et technique. Contrat n° 72-70320.

Les auteurs sont heureux de remercier R. Marie, Station d'Amélioration des Plantes,

I. N. R. A., Montpellier, qui a aimablement fourni les échantillons de riz ; B. LAIGNELET, Laboratoire de Technologie des Blés durs et du Riz, I. N. R. A., Montpellier, pour son aide dans l'interprétation statistique des résultats ; L. MICHIELS, pour ses conseils lors des essais d'appertisation.

## SUMMARY


### RICE PARBOILING : EFFECTS OF PROCESSING CONDITIONS AND VARIETAL FACTORS ON THE MILLED RICE CHARACTERISTICS

The effects of rice parboiling conditions on the quality of the products have been studied with a fully automatic laboratory-made equipment. The steeping time (10 or 30 mn) has no influence, while a slight increase in the steeping temperature (from 65° to 75°C) lowers the rice consistancy after canning ; changes in the steaming time (10, 20 or 30 mn) or in the steaming temperature (105, 112 or 120°C) deeply affect all the parameters : milling yield ; appearance, yellowing and gelatinization degree ; cooking quality ; canning stability. Yellowing is highly correlated to the consistancy of the cooked parboiled rice. *Arlesienne* appears to be the best among the eight french varieties which have been examined.


## RESUMEN


### SECADO DEL ARROZ. INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES DE TRATAMIENTOS Y DE LOS FACTORES VARIETALES RESPECTO A LAS CARACTERISTICAS DE LOS PRODUCTOS ACABADOS

Se ha procedido al estudio de la influencia de las condiciones de secado del arroz respecto a la calidad de los productos acabados, por medio de una instalación de laboratorio totalmente automática. La duración de inmersión (10 ó 30 min.) tiene poca influencia, mientras que un aumento reducido de la temperatura (65 a 75°C) tiene como consecuencia disminuir la consistencia del arroz después de la appertización. Los cambios en la duración del inyección de vapor (10, 20 ó 30 min.), así como en la temperatura de inyección (105, 112 ó 120°C), se manifiestan por efectos mucho más señalados respecto al conjunto de los parámetros estudiados : rendimiento de maquinado ; aspecto, amarilleo y grado de gelatinización del arroz secado, calidad culinaria y aptitud para el tratamiento de appertización. Se ha puesto también de manifiesto una relación sumamente significativa entre el amarilleo y la consistencia después de la cocción de los arroces secados. De las 8 variedades francesas estudiadas, *Arlésienne* es aquella que posee le mejor calidad.


## RIASSUNTO


### ESSICCAMENTO DEL RISO. INFLUENZA DELLE CONDIZIONI DI TRATTAMENTO E DEI FATTORI PROPRI AD OGNI VARIETA' SULLE CARATTERISTICHE DEI PRODOTTI FINITI

Mediante un impianto di laboratorio interamente automatico, è stata studiata l'influenza delle condizioni d'essiccamento del riso sulla qualità del prodotto finito. La durata della macerazione (da 10 a 30 min.) ha poca influenza mentre un debole aumento della temperatura (da 65° à 75°C) ha come effetto la diminuizione della consistenza del riso dopo processo Appert ; dei cambiamenti nella durata dell'iniezione di vapore (10,20 o 30 min.) e nella temperatura di questo vapore (105, 112 o 120°C) si traducono in effetti molto più marcati sull'insieme dei parametri studiati : rendimento alla lavorazione ; aspetto, ingiallimento e tasso di gelatinizzazione del riso essiccato ; qualità culinaria ; attittudine al processo Appert. Lo studio ha messo in evidenza un legame altamente significativo tra l'ingiallimento e la consistenza dopo la cottura del riso essiccato. Delle 8 varietà francesi che sono state oggetto degli studi, la qualità « Arlésienne » è la migliore.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ABECASSIS J., CAKMAKLI U., FEILLET P., 1974. La qualité culinaire des pâtes alimentaires. I. Méthode objective d'appréciation de la consistance des produits cuits. *Bull. Ecol. fr. Meun.*, **264**, 303-310.

ANGLADETTE A., 1966. *Le Riz.* Maisonneuve et Larose, Paris.

BHATTACHARYA K. R., SUBBA RAO P. V., 1966. Effects of processing conditions on quality of parboiled rice. *J. agric. Food Chem.*, **14** (5), 476.

BORASIO L., GARIBOLDI F., 1965. Parboiled rice. Production and use. *Rice J.*, **68** (5), 32-35, 41 ; **68** (8), 23-27.

DEMONT J. I., 1968. Effect of certain variables on canned rice quality. *Food Techn.*, **22** (9), 1186-1188.

DIMOPOULOS J.-S., MULLER H. G., 1972. Effect of processing conditions on protein extraction and composition and some other physicochemical characteristics of parboiled rice. *Cereal Chem.*, **49** (1), 54-62.

DUCIMETIÈRE P., 1970. *Les méthodes de la classification numérique.* R. S. A., vol. 17, n° 4.

FEILLET P., 1970. Note sur une méthode de contrôle du degré d'usinage du riz. *Bull. Riz.*, **129**, 17-21.

FEILLET P., REDON C., 1971. Recherche des meilleures conditions d'utilisation de la microrizerie de laboratoire « Universale ». *Bull. Riz.*, **136**, 11-17.

GARIBOLDI F., 1972. Parboiled rice. In HOUSTON D. F., *Rice chemistry and technology*, chap. 14, 358-380, AACC, St Paul, Minnesota.

JAYANARAYANAN E. K., 1965. Influence of processing conditions on the browning of parboiled rice. *Rice J.*, **68** (11), 16-19.

JOHNSON R. M., 1965. Light-reflectance meter measures degree of milling and parboiling of parboiled rice. *Cereal Chem.*, **42** (2), 167-174.

JULIANO B. O., 1972. The rice caryopsis and its composition. In HOUSTON D. F., *Rice chemistry and technology*, chap. 2, 16-74, AACC, St Paul, Minnesota.

LONCIN M., 1961. *Les opérations unitaires du génie chimique.* Dunod, Paris.

ROBERTS R. L., POTTER A. L., KESTER E. B., KENEASTER K. K., 1954. Effect of processing conditions on the expanded volume, color and soluble starch of parboiled rice. *Cereal Chem.*, **31** (2), 121-129.

SUBRAHMANYAN V., 1971. Recent advances in rice processing. *J. Sci. Ind. Res.*, **30** (12), 729-739.

WEBB B. D., ADAIR C. R., 1970. Laboratory parboiling apparatus and methods of evaluating parboil-canning stability of rice. *Cereal Chem.*, **47** (6), 708-714.

*Ann. Technol. agric.*, 1975, **24** (1), 25-33.

# DOSAGE DU FER DANS LES LACTOSÉRUMS PAR SPECTROMÉTRIE D'ABSORPTION ATOMIQUE

G. LINDEN et D. LORIENT

*I. U. T. Biologie appliquée et Laboratoire de Biochimie appliquée,*
*Université de Nancy I,*
*54037 Nancy Cedex*

## RÉSUMÉ

L'examen des différentes techniques permettant de doser, par spectrométrie d'absorption atomique, le fer contenu dans les lactosérums nous a conduit à opter pour une extraction du fer par un solvant organique.

Après libération du fer en milieu acide et à chaud, il est extrait quantitativement par la méthylisobutylcétone ; la phase solvant est ensuite nébulisée dans la flamme du spectromètre. Les protéines et le lactose sont éliminés et l'emploi du solvant entraîne une augmentation de la sensibilité. Les résultats obtenus sont également satisfaisants en ce qui concerne la répétabilité.

L'analyse d'un lot de 300 échantillons de lactosérums normaux permet de situer la teneur normale en fer à proximité de 0,15 mg/l.

Mots clés : *lactosérum, fer, spectrométrie d'absorption atomique.*

## INTRODUCTION

A l'heure actuelle, l'utilisation des lactosérums pose un problème important à l'industrie laitière (N., 1973). Longtemps considérés comme des sous-produits sans grande valeur, ils ne sont plus, de nos jours, rejetés dans la nature où ils accroissent la pollution, mais transformés pour une grande part en poudre destinée à l'alimentation du bétail. Dans cette optique et tout spécialement en ce qui concerne l'alimentation du veau de boucherie (veau blanc), les teneurs en fer des lactosérums doivent être les plus faibles possible. Or, les propriétés physico-chimiques du lactosérum prédisposent à de très graves corrosions par piqûres et en crevasses sur les équipements en métal utilisés pour le stockage ou la transformation de ces produits. Récemment, DAUFIN et TALBOT (1972) ont signalé et étudié ce phénomène sur le matériel en acier inoxy-

dable. Le matériel métallique est la principale cause de contamination en fer de certains lactosérums de fromagerie.

Pour déterminer la quantité de fer présente dans ce produit, on peut faire appel à des méthodes fort différentes dans leur principe, la méthode colorimétrique et celle fondée sur l'absorption atomique. Depuis une dizaine d'années, la spectrométrie d'absorption atomique a été introduite dans les laboratoires de recherche et de contrôle des industries agricoles et alimentaires et son développement a été particulièrement rapide (LINDEN, 1971).

Ayant à effectuer sur une grande échelle des analyses de fer dans les lactosérums, nous avons appliqué cette méthode et nous avons examiné les résultats en fonction du type de préparation. Enfin, nous avons procédé à une étude statistique des teneurs normales en fer des lactosérums normaux.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### *Matériel*

Spectromètre d'absorption atomique (Varian-Techtron), modèle 1200.

Conditions opératoires :

- longueur d'onde de la raie de résonance : 248,3 nm ;
- intensité de la lampe : 8 mA ;
- largeur de la fente : 0,2 nm ;
- flamme air-acétylène.

Les réactifs chimiques employés sont fournis par Prolabo (R. P.). Les solutions étalons de fer sont préparées à partir de fil de clavecin (Riedel De Haën) et d'acide chlorhydrique « Suprapur » (Merck).

Les échantillons de lactosérums provenaient de 10 fromageries situées dans l'est de la France. Ils ont été prélevés dans des flacons en polyéthylène et stockés dès réception à 4°C.

### *Méthodes analytiques*

Les techniques de dosage par absorption atomique que nous avons utilisées peuvent être classées en trois groupes.

1. *Méthodes directes.*

Les lactosérums ordinaires ont été, après homogénéisation par agitation à 40°C, nébulisés directement dans la flamme sans aucune préparation d'échantillon. Les lactosérums ayant un extrait sec nettement supérieur à 6 p. 100 ont été dilués au préalable. Les concentrations en fer ont été déterminées par comparaison avec les valeurs d'absorbance de solutions standards aqueuses de fer avec addition de substances pour compenser l'effet de matrice.

Nous avons préparé différentes solutions étalons contenant :

- des substances minérales : 7,85 g/l simulant la partie saline du lait selon la composition indiquée par JENNESS et KOOPS (1962) ;
- du lactose : 45 g/l ;
- des protéines du lactosérum lyophilisées : 6 g/l.

Nous avons mesuré les absorbances d'échantillons de lactosérum sans et avec ajouts de quantités connues de fer. Comme le recommande PINTA (1971), nous avons veillé à ce que les quantités ajoutées soient voisines de la teneur inconnue.

L'exploitation des résultats a été effectuée de manière graphique.

*2. Techniques avec minéralisation ou simple déprotéinisation.*

La matière organique des lactosérums a été détruite après minéralisation par voie sèche selon le protocole décrit par MORGAN (1964).

Certains échantillons ont été soumis à une déprotéinisation avec une solution d'acide trichloracétique. Après un chauffage de 90°C pendant 15 minutes suivi d'une centrifugation, on détermine la teneur en fer du surnageant en comparant l'absorbance à des solutions standards préparées dans les mêmes conditions.

*3. Techniques avec extraction du fer.*

Le fer, après complexation en présence de bathophénantroline ou d'acide chlorhydrique concentré, est extrait par un solvant organique. On peut ainsi éliminer les éléments gênants dans la flamme et obtenir une concentration du fer dans un volume minimum de solvant organique.

Finalement, c'est à ce dernier type de méthode que nous avons recours dans les conditions suivantes.

La libération du fer est obtenue par action de l'acide chlorhydrique concentré à chaud. En utilisant un volume de lactosérum pour deux volumes d'acide chlorhydrique concentré, on atteint une normalité d'environ 8N permettant une extraction quantitative par la méthylisobutylcétone (MIBC) (CHARLOT, 1969). La solution organique est nébulisée directement dans la flamme du spectromètre d'absorption atomique. L'étalonnage est réalisé à partir de solutions aqueuses de fer traitées dans les mêmes conditions. Afin de prévenir tout phénomène de corrosion, le nébuliseur est en tantale.

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

La spectrométrie d'absorption atomique, méthode séduisante dans son principe, a la réputation d'être simple. Cette simplicité n'est toutefois qu'apparente. Ainsi, le problème de la préparation de l'échantillon doit être soigneusement examiné en liaison avec celui des interactions physiques ou chimiques auxquelles on peut avoir affaire. Les interactions sont elles-mêmes conditionnées par le type de flamme utilisé.

### *Choix de la flamme*

Dans la recherche des conditions optimales de l'analyse, le choix du type de flamme est primordial. Le dosage du fer avec une flamme air-acétylène, riche en combustible (réductrice) améliore la sensibilité, mais nous avons vérifié que les interactions dues à la présence d'ions (phosphate, ammonium, sodium, potassium) dans la solution se trouvent augmentées (CURTIS, 1969). Aussi, il est préférable d'opérer avec une flamme de type oxydante.

Lors de la nébulisation de solvant organique (MIBC), la flamme doit présenter un aspect bleu clair et l'on réduit pour ce faire le débit de l'acétylène. Dans ces conditions, l'absorption à 248,3 nm due à la flamme est la plus faible.

### *Interactions*

Dans un premier temps, l'analyse du fer par spectrométrie d'absorption atomique s'est révélée assez exempte d'interactions (ALLAN, 1959). Toutefois, les perfectionnements instrumentaux aidant, cette constatation s'est trouvée infirmée.

La nébulisation de lactosérums ordinaires non dilués peut produire, par suite

du changement de viscosité, une variation de la quantité de solution nébulisée dans la flamme. Cette perturbation de type physique est de faible amplitude.

De plus, un bon nombre de lactosérums ne sont pas parfaitement homogènes ; des traces de matières grasses, de protéines dénaturées et surtout des précipités composés essentiellement de protéines et de lactose perturbent la nébulisation.

Les interactions les plus gênantes sont provoquées par des réactions chimiques dans les flammes. Pour étudier l'action des principales substances du lactosérum, nous avons procédé à une reconstitution de matrice. L'examen de la figure 1 montre

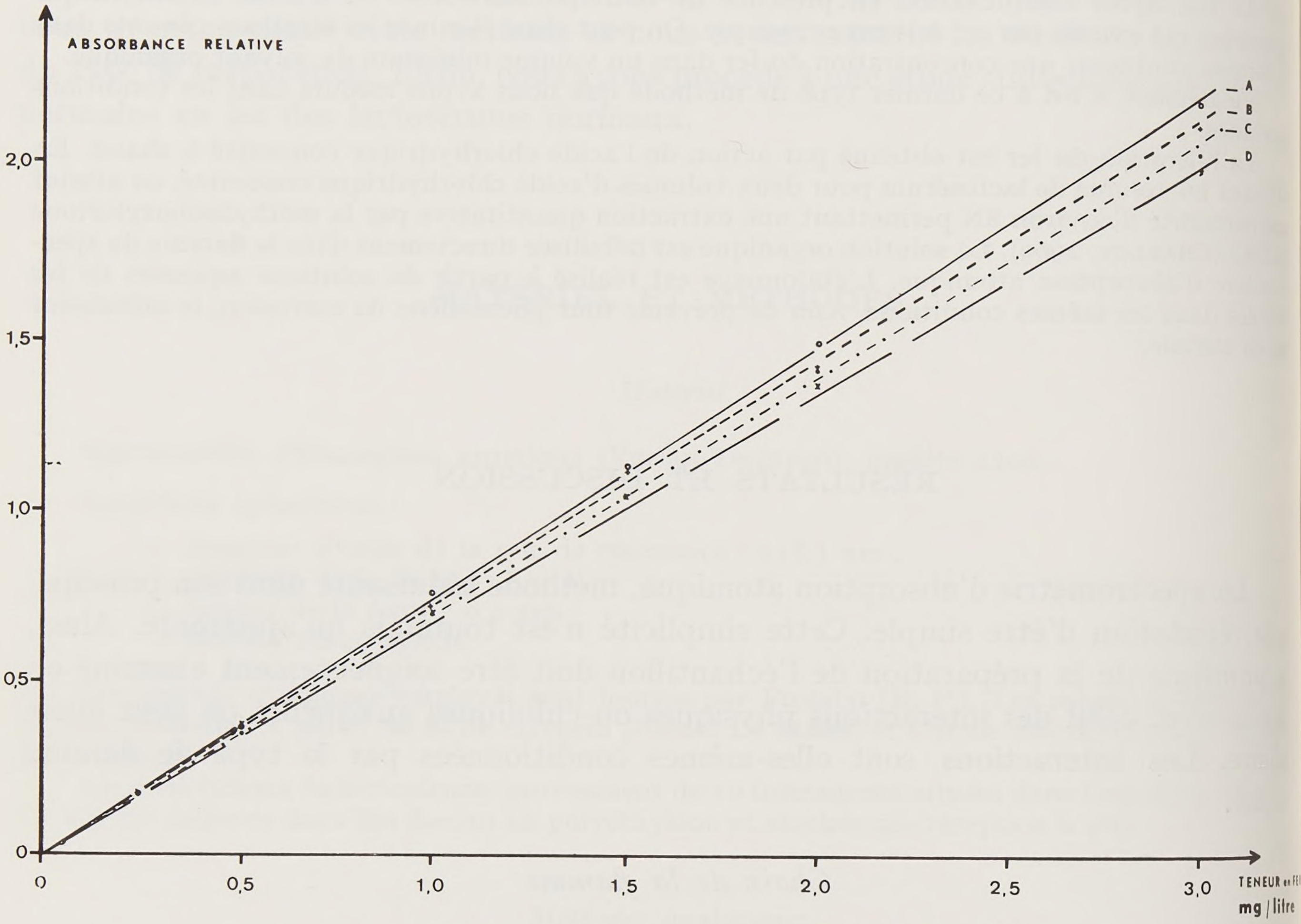



Fig. 1. — *Courbes d'absorbance de solutions étalons de fer*

(A) : eau permutée ;
(B) : eau plus 7,58 g/l de substances minérales ;
(C) : solution B plus 45 g/l de lactose ;
(D) : solution C plus 6 g/l de protéines du lactosérum lyophilisées.

que la présence de substances minérales (courbe B) entraîne une baisse d'absorbance ; l'addition supplémentaire de lactose amplifie ce phénomène (courbe C). L'effet des protéines est moindre et pratiquement nul pour les solutions ayant une teneur en fer inférieur à 1,5 µg/ml. A des concentrations en fer plus élevées, la baisse d'absorbance est plus importante (courbe D).

Bien que l'emploi d'une flamme oxydante diminue nettement les interactions chimiques, on constate que la présence de ces substances dans la flamme entraîne une diminution de l'absorbance de 10 p. 100.

Nous avons, en outre, vérifié en utilisant une lampe au deutérium que les lactosérums ou les solutions complexes examinées ne présentaient pas le phénomène d'absorption non spécifique (« scattering effect »).

*Étude des différentes méthodes*

Le lactosérum présente une teneur en matières organiques trop élevée pour être employé directement. En plus de la baisse d'absorbance signalée, la nébulisation de 3 ou 4 échantillons entraîne — par suite du dépôt de produits carbonés dû essentiellement au lactose — une obturation progressive de la fente du brûleur. La variation dans le volume d'aérosol arrivant dans la flamme interdit donc tout dosage dans des conditions satisfaisantes. A ce handicap, s'ajoute celui d'un « bruit de fond » très prononcé du signal.

Des essais de dosage direct sur des lactosérums homogénéisés, et sur les surnageants et les précipités issus d'une centrifugation de ces mêmes lactosérums, montrent que les particules insolubles, en suspension ou sédimentées, renferment des quantités appréciables de fer, ce qui rend impossible une bonne homogénéité de l'échantillonnage. En général, après centrifugation, le lactosérum perd jusqu'à 20 p. 100 de sa teneur en fer, la matière grasse résiduelle et les protéines dénaturées s'en trouvant fortement enrichies. Cette hétérogénéité est naturellement accentuée pour les lactosérums concentrés ; en conséquence, nous pesons la totalité de l'échantillon avant de le ramener à un volume final 2 à 3 fois plus élevé.

La méthode des ajouts dosés est plus exacte, mais elle présente le défaut d'exiger la préparation, pour chaque solution à analyser, d'au moins deux ou trois solutions avec ajout. Cependant, lorsqu'on dispose de séries d'échantillons dont les teneurs sont du même ordre de grandeur, on peut utiliser l'un d'entre eux pour établir la droite d'étalonnage et l'on effectue quelques vérifications par la méthode normale des ajouts (PINTA, 1971). En outre, cette méthode implique une linéarité entre les concentrations et l'absorbance, la totalité de l'absorption mesurée étant bien due à l'élément dosé.

D'après ce qui précède, on voit que la méthode des ajouts ne peut être généralisée pour des analyses de routine dans des lactosérums contenant des taux très variables de fer. De surcroît, l'obturation de la fente du brûleur se produit également après le passage d'une dizaine d'échantillons dilués au demi.

Les méthodes directes étant exclues, nous avons eu recours à une destruction de la matière organique par voie sèche. Cette technique est simple et permet de préconcentrer, le cas échéant, l'échantillon. Ce procédé est cependant délicat à mettre en œuvre pour le dosage du fer ; le danger de contamination est, dans le cas présent, un facteur limitant.

L'emploi de l'acide trichloracétique permet, certes, d'éliminer les protéines, mais le passage direct du surnageant dans la flamme ne permet pas d'éliminer les inconvénients majeurs de la nébulisation du lactosérum : obturation progressive de la fente du brûleur, instabilité du signal.

Lorsque la précipitation avec l'acide trichloracétique est suivie d'une chélation du fer avec la bathophénanthroline puis d'une extraction dans la MIBC, ces obstacles sont levés. Nous avons cependant préféré la libération du fer par action de l'acide chlorhydrique concentré à chaud suivie d'une extraction dans le même solvant organique, car la séparation des phases aqueuse et organique est meilleure et les opérations sont plus simples.

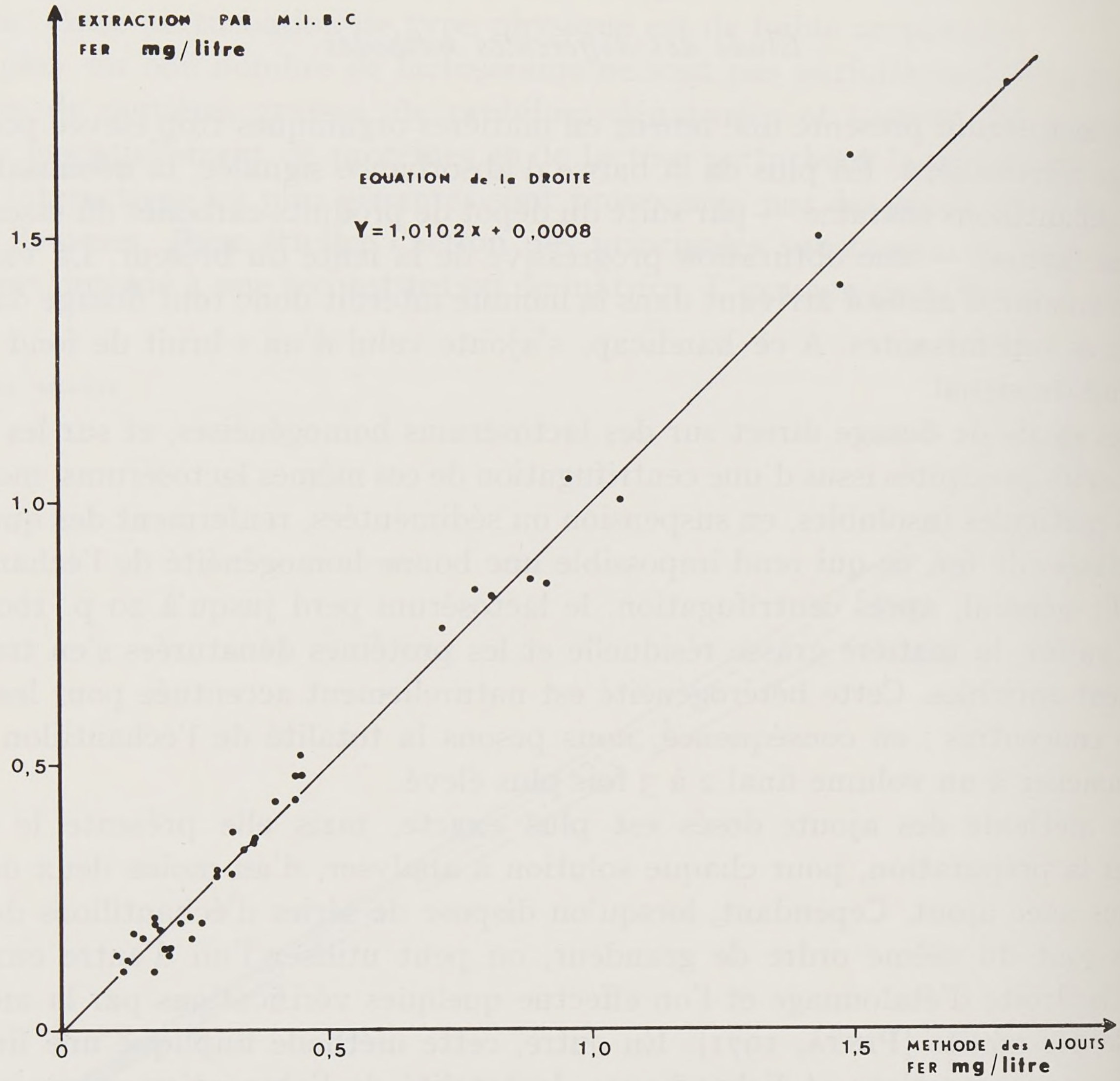



FIG. 2. — *Résultats obtenus avec la technique d'extraction par la MIBC et la méthode des ajouts*

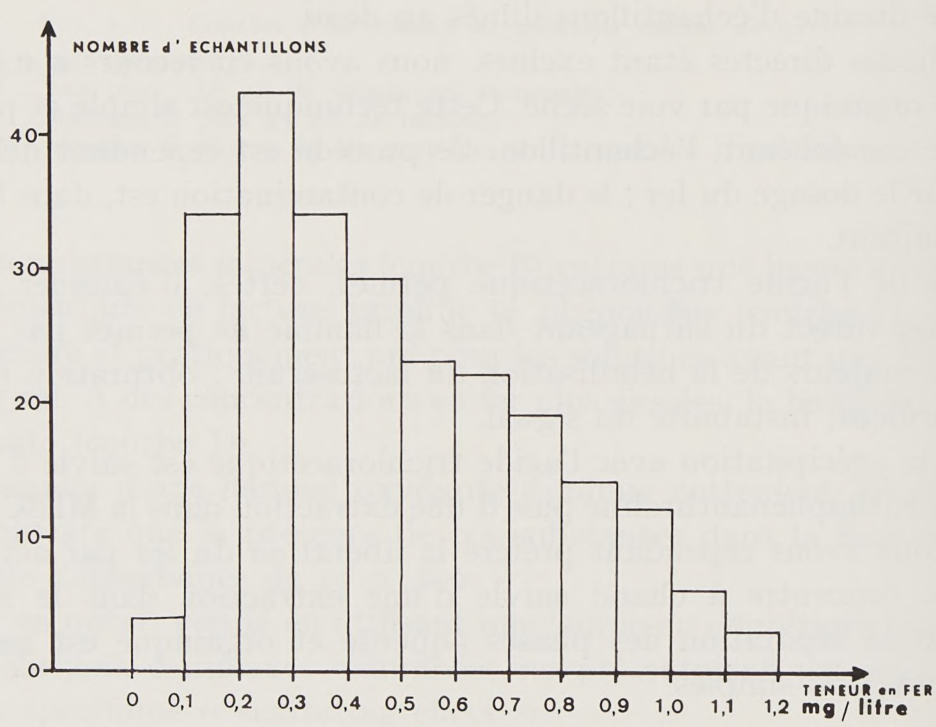



FIG. 3. — *Histogramme des teneurs en fer de 300 échantillons de lactosérums normaux*

### *Intérêt de la technique proposée*

L'extraction par la MIBC est totale après une agitation de 30 secondes. Il n'est pas nécessaire de procéder à une centrifugation pour obtenir une bonne séparation des phases. La légère solubilité de la cétone dans l'eau en milieu très acide conduit, après agitation, à l'obtention d'un volume de solvant organique inférieur de 20 p. 100 à celui introduit. Si l'on opère dans les mêmes conditions pour la gamme-étalon et les différents dosages, ce fait n'altère pas les résultats.

Afin de juger de la valeur de la technique d'extraction, nous avons dosé plusieurs fois de suite le même sérum et calculé l'écart-type. Les résultats obtenus (tabl. 1) montrent que la répétabilité est satisfaisante.

TABLEAU I

*Répétabilité de la technique par extraction du fer sur un échantillon de lactosérum*

| Nombre de dosages | Moyenne (mg/l) | Écart-type | Coefficient de variation (%) | Intervalle de confiance |
|---|---|---|---|---|
| 12 | 0,220 | 0,011 4 | 5,1 | ± 0,007 2 |

La technique proposée a été comparée avec la méthode des ajouts dosés.

Le diagramme de corrélation (fig. 2) montre que la technique proposée fournit des résultats très comparables à ceux obtenus avec la méthode des ajouts. Cette équivalence des méthodes est confirmée par le calcul du coefficient de corrélation dont la valeur est de 0,993 7.

Si la valeur intrinsèque d'une méthode analytique est fondée essentiellement sur des critères de qualité : justesse, fidélité, sensibilité, il faut cependant tenir compte, dans le cas d'une analyse de routine, de la simplicité et de la rapidité de la technique. Or, le mode opératoire que nous proposons est suffisamment rapide pour permettre de traiter 10 échantillons de lactosérums et une courbe d'étalonnage en moins de quatre-vingt-dix minutes.

### *Teneurs normales en fer du lactosérum*

Les teneurs en fer des lactosérums publiées jusqu'à présent faisaient état de valeurs correspondant à des échantillons n'ayant subi ni stockage, ni traitement industriel.

L'histogramme de la figure 3 réalisé à partir de l'analyse de 300 échantillons montre que les teneurs les plus fréquentes des lactosérums ordinaires de fromagerie sont proches de 0,2 mg/l. Environ 10 p. 100 d'échantillons renferment plus de 1,2 mg/l ; cette forte contamination accidentelle provient de mauvaises conditions de récupération, de stockage et de transport.

Par suite d'un effort d'équipement, la proportion de fer de contamination diminue, ce qui permet de situer la teneur normale au voisinage de 0,15 mg/l.

*Reçu pour publication en décembre 1974.*

## REMERCIEMENTS

Nous remercions M. le Professeur Ch. Alais, Chef de notre groupe de Recherche, pour ses précieux conseils.

Nous remercions également M[mes] Y. Muller et M. Frayard pour leur aide technique et MM. J. Guérin et F. Aguilon pour leur cordiale collaboration.



## SUMMARY

### DETERMINATION OF IRON IN CHEESE WHEY BY ATOMIC ABSORPTION SPECTROMETRY

The determination of the iron level in cheese whey by atomic absorption spectrometry needs a preliminary extraction by an organic solvent.

The sample is acidified by hydrochloric acid and the ionized iron is extracted after heating by methylisobutyl ketone. Proteins and lactose remain in the aqueous phase. Atomic absorption measurements are carried out on the extract. The sensitivity is improved by using this solvent and repetability is good.

The analysis of 300 samples of cheese whey shows an iron level of about 0.15 mg/l.



## RESUMEN

### DOSIFICACION DEL HIERRO EN LOS LACTOSUEROS POR ESPECTROMETRIA DE ABSORCION ATOMICA

El examen de las distintas técnicas que permiten dosificar — por espectrometría de absorción atómica — el hierro contenido en los lactosueros, nos ha conducido a optar por una extracción del hierro mediante un disolvente orgánico.

Tras liberación del hierro, en medio ácido y en caliente, se procede a su extracción cuantitativamente por medio de metilisobutilcetona. La fase disolvente es nebulizada acto seguido en la llama del espectrómetro. Las proteinas y la lactosa son eliminadas y el empleo del disolvente acarrea un aumento de la sensibilidad. Los resultados obtenidos son, asimismo, satisfactorios por lo que se refiere a la repetibilidad.

El análisis de una partida de 300 muestras de lactosueros normales permite situar el contenido normal en hierro en las cercanías de 0,15 mg/l.



## RIASSUNTO

### DOSAGGIO DEL FERRO NEI LATTOSIERI MEDIANTE SPETTROMETRIA D'ASSORBIMENTO ATOMICO

Lo studio delle varie techniche che permettono di dosare il ferro contenuto nei lattosieri mediante spettrometria d'assorbimento atomico, ci ha portato a utilizzare un solvente organico per l'estrazione del ferro.

Dopo la sua liberazione in ambiente acido e a caldo, il ferro va estratto quantitativamente mediante metilisobutilchetone ; la fase solvente viene poi nebulizzata nella fiamma dello spettrometro. Le proteine e il lattosio sono eliminati e l'uso del solvente provoca un aumento della sensibilità. I risultati ottenuti sono ugualmente soddisfacenti per quanto riguarda la ripetibilità.

L'analisi di una serie di 300 campioni di lattosieri normali permette di valutare il tenore normale di ferro a circa 0,15 mg/l.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ALLAN J. E., 1959. The determination of iron and manganese by atomic absorption. *Spectrochim. Acta*, **15**, 800-806.

CHARLOT G., 1966. *Les méthodes de la chimie analytique*, 5$^{e}$ éd., 734, Masson, Paris.

CURTIS K. E., 1969. Interferences in the determination of iron by atomic absorption spectrophotometry in an air-acetylene flame. *Analyst*, **94**, 1068-1071.

DAUFIN G., TALBOT J., 1972. Corrosion par piqûres des aciers inoxydables par des lactosérums. *Lait*, **52**, 688-699.

JENNESS R., KOOPS J., 1962. Preparation and properties of a salt solution which simulates milk ultra filtrate. *Neth. Milk Dairy J.*, **16**, 153-164.

LINDEN G., 1971. Applications de la spectrométrie d'absorption atomique dans les laboratoires d'industrie alimentaire. *Ind. alim. agric.*, **88**, 793-803.

MORGAN M. E., 1964. The determination of copper in milk by atomic absorption spectroscopy. *Atom. Abs. Newsletter*, (21), 1-3.

N., 1973. *Les lactosérums. Traitements et utilisations.* Monographie APRIA, Paris.

PINTA M., 1971. *Spectrométrie d'absorption atomique*, tome 1, 233, Masson, Paris.

*Ann. Technol. agric.*, 1975, **24** (1), 35-45.

# CONSERVATION DE CRÈME DE LEVURE POUR L'ALIMENTATION ANIMALE

M. NAMORY

*Station de Technologie des Produits végétaux,*
*Centre de Recherches agronomiques des Antilles et de la Guyane, I. N. R. A.,*
*Domaine Duclos, 97170 Petit-Bourg, (Guadeloupe)*

## RÉSUMÉ

Dans le but de définir un procédé de conservation de la levure humide pour l'alimentation animale, on a cherché à empêcher, au laboratoire à 30°C, la dégradation par autolyse d'une suspension de cellules vivantes de levure contenant 13 p. 100 de substance sèche.

Par addition d'agents chimiques tels que les acides acétique, chlorhydrique ou propionique ou de métabisulfite de potassium ou d'aldéhyde formique, il est possible de conserver pendant huit jours la suspension de cellules de levure. Les agents les plus efficaces sont l'acide chlorhydrique (1 g par litre) et la formaldéhyde (2 g par litre).

En les combinant, il est possible de prolonger pendant deux mois la conservation et de réduire considérablement le nombre de cellules vivantes. Il y a une autolyse partielle. A doses élevées (5 à 20 g par litre), ces agents induisent un important relargage du phosphore soluble intra-cellulaire dans les premières vingt-quatre heures. A des taux faibles (1 g par litre), le relargage est du même ordre que celui provoqué par l'autolyse.

Après chauffage et refroidissement d'une suspension de cellules de levures, on obtient une bonne conservation par addition de *Lactobacillus plantarum* ($10^2$ cellules par ml) qui par sa croissance abaisse le pH de 4,5 à 3,9. En présence de cet agent, la croissance de *B. cereus* et *Clostridium sporogenes* ne peut être observée. Des taux faibles des acides mentionnés plus haut n'empêchent pas la croissance de *Lactobacillus*. Quand on traite la suspension de cellules par la formaldéhyde, on ne peut déceler au bout de dix jours ni *Lactobacillus* ni germes sporulés.

Mots clés : *levure aliment, alimentation animale, conservation.*

Il a paru intéressant de rechercher une méthode permettant de conserver, sans les sécher, des levures destinées à l'alimentation animale. En effet, le séchage est un procédé onéreux qui nécessite une consommation importante d'énergie. La récupération des levures dans les distilleries ou brasseries serait plus fréquente si elle pouvait se faire sans qu'il soit nécessaire d'installer un atelier de séchage.

On a cherché à savoir si les techniques de l'ensilage pouvaient s'appliquer à la crème de levure. Pour cela, il était nécessaire de limiter le développement bactérien et l'autolyse à un niveau aussi faible que possible. Des essais de laboratoire ont été faits avec de la levure de boulangerie qui a servi de modèle.

Des essais analogues avaient été faits par RAFF (1967) sur des levures récupérées

de vin et de bière. Il a pu obtenir des résultats satisfaisants en utilisant des mélanges d'acide chlorhydrique et d'acide sulfurique qui amènent la crème à un pH compris entre 2,5 et 3,5. On note cependant une transformation de l'azote protéique en azote soluble à la suite de l'autolyse. VOSTI et JOSLYN (1954) ont effectivement montré que l'apparition de formes solubles d'azote et de phosphore se produit au cours de la conservation des levures. Les conditions les plus favorables à cette transformation sont un pH de 4,4 et une température de 45°C. CORDONNIER (1966), HOUGH et MADDOX (1970) ont montré que les levures libèrent dans le milieu plusieurs enzymes protéolytiques qui n'ont pas le même pH optimal. L'autolyse est donc orientée par le pH du milieu où les levures se trouvent en suspension.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 1. — *Crème de levure*

Une crème de levure est préparée à partir de pains de levure de boulangerie du commerce dispersés dans de l'eau de façon à obtenir une teneur en matière sèche d'environ 13 p. 100. Les essais de conservation après addition de divers produits ont lieu en plaçant les levures dans des flacons de 125 ml hermétiquement bouchés. Ces flacons sont portés à l'étuve à 30°C. Dans certains essais, la crème de levure a été contaminée avec des cultures de *Bacillus cereus* et *Clostridium sporogenes*. Dans d'autres cas, on a ajouté à la crème de levure une culture de *Lactobacillus plantarum* (*L. arabinosus*) en vue d'obtenir une acidification du milieu.

### 2. — *Milieux de culture*

Le dénombrement des levures revivifiables a été effectué sur milieu de Wickerham à base de malt et additionné de 1 p. 1000 de terramycine pour inhiber la croissance des bactéries.

Le dénombrement de *B. cereus* a été fait sur le milieu gélosé BLT contenant : lactose 3 g, bactotryptone 10 g, peptone Evans 5 g, lablemco 4 g pour 1 litre à pH = 6,8.

*Cl. sporogenes* a été compté en tubes profonds dans le milieu gélosé sélectif VL contenant : bactotryptone 5 g, protéosepeptone (n° 3) 5 g, extrait de viande 3 g, extrait de levure 5 g, glucose 2 g, amidon soluble 5 g, NaCl 5 g, chlorhydrate de cystéine 0,4 g pour 1 litre à pH = 7,6. On dénombre les bactéries sulfite réductrices en ajoutant au milieu avant ensemencement 1 ml de sulfite de sodium à 5 p. 100 et 0,2 ml d'alun de fer ammoniacal à 5 p. 100.

Les *Lactobacillus* ont été dénombrés sur milieu APT Difco additionné d'actidione pour éviter le développement des levures.

### 3. — *Dosage du phosphore soluble*

On s'est inspiré de la méthode déjà utilisée par VOSTI et JOSLYN (1954) pour étudier la cinétique de l'autolyse. Les levures de la crème sont séparées par centrifugation à 3 800 *g*, et le phosphore est dosé dans le liquide surnageant. Il est minéralisé par voie humide en milieu sulfurique. Le résidu de l'attaque est décoloré par l'eau oxygénée concentrée. Le phosphore minéral est déterminé par colorimétrie avec le réactif vanado-molybdique (CHARLOT, 1961).

## RÉSULTATS

### 1. — *Addition de divers produits en vue de conserver la crème de levure*

On a utilisé les produits suivants : acide chlorhydrique, acide acétique, acide lactique, acide propionique, métabisulfite de potassium, formol en solution à 30 p. 100. Les concentrations en formol sont exprimées en poids d'aldéhyde formique et non

TABLEAU I

*Efficacité de divers produits chimiques sur la conservation à 30°C de la crème de levure non chauffée*

Quantité minimale d'agent, en g de produit pur, à ajouter par litre de crème pour permettre une conservation de 8 et 15 jours. Les déterminations sont faites sur la crème après 8 et 15 jours de conservation

| Agents conservateurs utilisés | | Acide chlorhydrique | Acide acétique | Acide lactique | Acide propionique | Métabisulfite de potassium | Formol | Témoin |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Dose nécessaire pour une conservation de 8 jours (g/l) | Dose | 1 | 4 | 4 | 6 | 2 | 2 | 0 |
| | pH | 4,8 | 4,5 | 4,3 | 4,3 | 4,7 | 4,5 | 4,2 |
| | N | $10^9$ | $10^8$ | $10^7$ | — | $10^7$ | $10^7$ | $10^8$ |
| | T | T > 8 | 8 < T < 15 | 8 < T < 15 | T < 8 | 8 < T < 15 | 8 < T < 15 | T < 4 |
| Dose nécessaire pour une conservation de 15 jours (g/l) | Dose | 1 | 6 | 6 | 10 | 4 | 4 | 0 |
| | pH | 4,3 | 4,6 | 4,3 | 4,3 | 5 | 4,5 | 6 |
| | N | $10^6$ | $10^6$ | $10^7$ | N < 1 | $10^8$ | N < 1 | $10^2$ |
| | T | T > 15 | T > 15 | T > 15 | T > 15 | T > 15 | T > 15 | T < 4 |

N : Nombre de cellules vivifiables au moment du contrôle.
T : Nombre de jours à partir duquel apparaissent les mauvaises odeurs.
Crème de levure : à 13 p. 100 de matières sèches. Densité : 1,01.
Population initiale : No = $10^{11}$ cellule par ml.

pas en poids de solution. Après 8 jours et après 15 jours de conservation à 30°C, on mesure le pH et la teneur en cellules revivifiables ; on note aussi le moment auquel des odeurs putrides apparaissent.

Les résultats de ces essais sont donnés dans le tableau 1. La crème de levure qui avait au départ un pH de 5,5 s'acidifie spontanément pour atteindre 4,2 après 8 jours. On note cependant qu'une putréfaction se produit, entraînant l'apparition de mauvaises odeurs dès le quatrième jour. L'acide propionique à la dose de 6 g/l n'est pas efficace. Les acides acétique, chlorhydrique, lactique, le métabisulfite et le formol permettent d'atteindre des durées de conservation supérieures à 8 jours sans toutefois empêcher l'autofermentation des cellules. On constate en effet un fort dégagement de gaz carbonique faisant mousser la crème de levure ; il est dû vraisemblablement à la fermentation des réserves intracellulaires.

Pour atteindre une conservation supérieure à quinze jours, il est nécessaire d'augmenter les doses des produits utilisés. Le moins efficace est l'acide propionique à 10 g/l et le plus efficace est l'acide chlorhydrique à 1 g/l.

On peut obtenir une conservation satisfaisante des levures en les additionnant d'un mélange d'acide chlorhydrique et des autres produits. Le tableau 2 donne les résultats obtenus. On constate que la conservation se fait alors pendant deux mois sans dégagement de mauvaises odeurs.

TABLEAU 2

*Conservation à 30°C de la crème de levure non chauffée par un mélange d'acide chlorhydrique et d'autres conservateurs*

| Agents conservateurs utilisés | | Acide acétique | Acide lactique | Acide propionique | Métabisulfite de potassium | Formol |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Action des agents en mélange avec 1 g d'acide chlorhydrique par litre de crème | Dose | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| | pH | 4,5 | 4,5 | 4,1 | 4,5 | 4,3 |
| | N | — | $10^6$ | $10^6$ | $10^7$ | 49 |
| | T | T > 60 | T > 60 | T > 60 | T > 60 | T > 60 |

(mêmes conditions que le tableau 1)

La survie des levures diminue fortement pendant la conservation. L'addition de formol seul à 4 g/l permet d'abaisser la survie jusqu'à 1 à 10 levures/ml. Le même résultat est atteint après quinze jours en ajoutant par litre de crème 10 g d'acide propionique, 20 g d'acide lactique et 20 g d'acide acétique. L'acide chlorhydrique et le formol se révèlent être les agents de conservation les plus efficaces ; par la suite on ne s'est plus intéressé qu'à ces deux produits. Le mélange acide chlorhydrique 1 g/l, formol 2 g/l permet de diminuer à un niveau acceptable le nombre de cellules vivantes et d'éviter le développement des moisissures.

## 2. — *Autolyse au cours de la conservation*

L'autolyse a été mesurée par le dosage du phosphore solubilisé au cours de la conservation. La figure 1 montre l'augmentation du phosphore soluble dans les dix premiers jours de la conservation en présence de quantités variables d'acide chlorhydrique et de formol.

Dans l'essai témoin et dans celui qui a reçu 1 g/l de formol, les mauvaises odeurs apparaissent après quatre jours. Malgré cela la solubilisation du phosphore reste faible ; elle n'augmente d'ailleurs pas avec les quantités croissantes de formol, mais passe par un maximum en présence de 5 g/l. Le dégagement de gaz carbonique, conséquence de l'autofermentation, ne se produit que dans l'essai témoin et ceux contenant moins de 5 g d'agent (formol ou acide chlorhydrique) par litre de crème. En présence d'acide chlorhydrique, en revanche, la solubilisation du phosphore augmente régulièrement avec la dose. Comme elle est rapide dès le début de la conservation, on pense qu'une partie du phénomène peut être due à la libération dans le milieu de phosphore soluble déjà présent à l'intérieur des cellules.

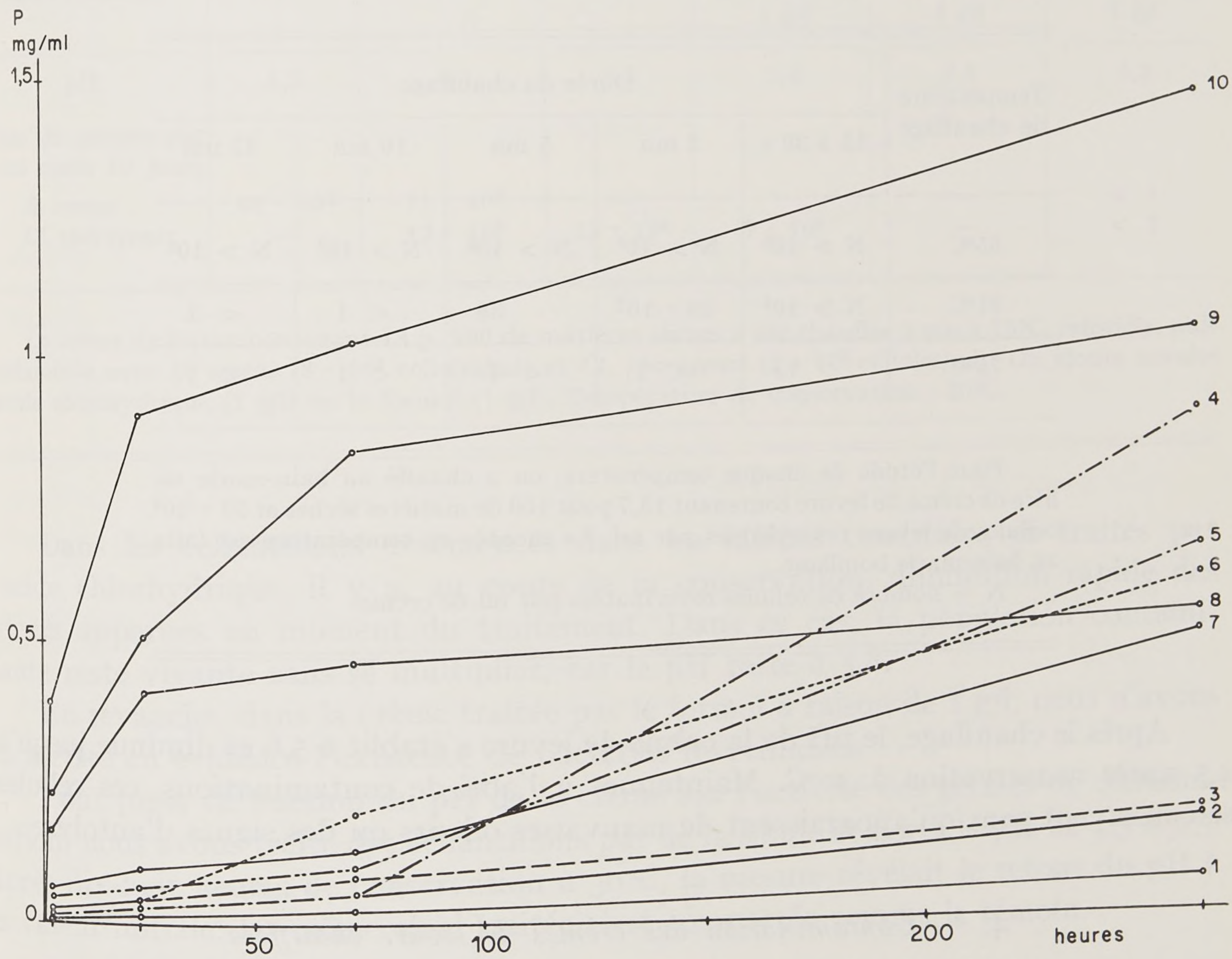



FIG. 1. — *Libération du phosphore soluble par action d'acide chlorhydrique et de formol sur la crème de levure*

Crème de levure à 13 p. 100 de matière sèche conservée pendant des temps différents à 30°C en présence de HCl et de formol. Le phosphore soluble est déterminé sur le surnageant

| | | |
|---|---|---|
| 1 Témoin 2°C | 3 Formol 1 g/l | 7 HCl 1 g/l |
| 2 — 30°C | 4 — 5 g/l | 8 — 5 g/l |
| | 5 — 10 g/l | 9 — 10 g/l |
| | 6 — 20 g/l | 10 — 20 g/l |

### 3. — *Chauffage de la crème de levure*

Les levures destinées à l'alimentation animale doivent être chauffées pour éviter qu'elles ne se multiplient dans le tractus digestif. Nous avons recherché les conditions minimales qui permettent d'empêcher la levure de se multiplier.

Pour cela, on chauffe au bain-marie dans un ballon 1 litre de crème de levure. La montée en température est effectuée dans de l'eau bouillante en agitant la crème de levure avec un barreau aimanté. Lorsque la température désirée est atteinte, le ballon est placé dans un thermostat préalablement porté à cette température.

Les résultats de ces essais sont donnés dans le tableau 3. Les durées de chauffage indiquées sont comptées à partir du moment où la température est atteinte. On a ainsi déterminé les durées minimales pour obtenir l'inactivation des levures. Il faut les maintenir sept minutes à 71°C ou une minute à 75°C.

TABLEAU 3

*Inactivation thermique des cellules dans la crème de levure*

| Température de chauffage | Durée du chauffage | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 15 à 30 s | 2 mn | 5 mn | 10 mn | 15 mn |
| 65°C | $N > 10^5$ | $N > 10^5$ | $N > 10^5$ | $N > 10^5$ | $N > 10^5$ |
| 71°C | $N > 10^5$ | $20 \cdot 10^2$ | 38 | < 1 | < 1 |
| 75°C | 15 | < 1 | < 1 | < 1 | < 1 |

Pour l'étude de chaque température, on a chauffé au bain-marie un litre de crème de levure contenant 13,7 pour 100 de matières sèches et $50 \cdot 10^9$ cellules de levure revivifiables par ml. La montée en température est faite au bain-marie bouillant.

N = nombre de cellules revivifiables par ml de crème.

Après le chauffage, le pH de la crème de levure s'établit à 5,6 et diminue jusqu'à 4,5 après conservation à 30°C. Maintenues à l'abri de contaminations, ces cellules se conservent sans qu'apparaissent de mauvaises odeurs ou des signes d'autolyse.

### 4. — *Contamination des crèmes de levure chauffées*

Avec des crèmes de levures contaminées expérimentalement par *B. cereus* et *C. sporogenes*, nous avons vérifié que le mélange acide chlorhydrique-formol permet de limiter l'altération pendant la conservation.

Des échantillons de 100 ml de crème de levure sont ensemencés avec l'un ou l'autre germe ou avec un mélange des deux. Les populations initiales par ml de levure liquide sont les suivantes : *Cl. sporogenes*, $2 \cdot 10^5$ cellules bactériennes

(dont $8 \cdot 10^3$ sporulées), *B. cereus*, $8 \cdot 10^4$ cellules bactériennes (dont $10^2$ sporulées). Les résultats de l'essai sont donnés dans le tableau 4.

Après dix jours de conservation à 30°C, les échantillons de crème contaminés, mais dépourvus d'agent conservateur, laissent apparaître de mauvaises odeurs caractéristiques du germe ensemencé. Nous n'avons pas relevé de variation du pH qui reste fixe (4,3 et 4,5), ni de multiplication de la population contaminante.

TABLEAU 4

*Conservation par voie chimique d'une crème de levure chauffée et contaminée expérimentalement*

| Germe contaminant | *B. cereus* | *B. cereus* + *Cl. sporogenes* | *Cl. sporogenes* | *Cl. sporogenes* | *B. cereus* + *Cl. sporogenes* | *B. cereus* + *Cl. sporogenes* |
|---|---|---|---|---|---|---|
| agent chimique | 0 | 0 | 0 | acide chlorhydrique 1 g/l | acide chlorhydrique 1 g/l | formol 1 g/l |
| pH | 4,5 | 4,3 | 4,3 | 3,8 | 3,8 | 5,3 |
| Nbre de germes par ml après 10 jours | | | | | | |
| *B. cereus* | $62 \cdot 10^2$ | $71 \cdot 10^2$ | — | | — | < 1 |
| *Cl. sporogenes* | — | $12 \cdot 10^4$ | $15 \cdot 10^4$ | $7 \cdot 10^4$ | — | < 1 |

La crème de levure contenant 13 p. 100 de matières sèches a été chauffée 5 mn à 75°C, refroidie, puis contaminée avec *B. cereus* ($8 \cdot 10^4$ cellules/ml) et *Cl. sporogenes* ($2 \cdot 10^5$ cellules/ml). On ajoute ensuite l'acide chlorhydrique (1 g/l) ou le formol (1 g/l). Température de conservation : 30°C.

Dans les échantillons ensemencés dans les mêmes conditions et traités par l'acide chlorhydrique, il y a, au cours de la conservation, diminution rapide des odeurs apparues au moment du traitement. Dans ce cas, la population contaminante reste vivante sans se multiplier, car le pH reste à 3,8.

En revanche, dans la crème traitée par le formol à raison de 1 g/l, nous n'avons pu mettre en évidence l'existence de bactéries revivifiables.

Pour juger de l'action du pH de la crème sur l'activité des germes de contamination, nous avons traité des échantillons par de la soude et porté le pH de 4,5 à 7,5. Après dix-huit heures de conservation à 30°C, la mesure révélait le retour du pH à sa valeur initiale. La crème ainsi traitée s'est comportée comme le témoin.

### 5. — *Conservation à l'aide de* Lactobacillus

Des échantillons de crème de levure, préalablement ensemencés avec une souche de *L. plantarum* au taux de $10^2$ germes par ml, sont traités par différents agents chimiques ou ensemencés par les bactéries de contamination. Les résultats de l'essai sont portés dans le tableau 5.

La levure non contaminée se conserve bien et présente une odeur agréable. La crème subit une diminution de pH de 4,5 à 3,9. Après quinze jours de conservation à 30°C, on note encore la présence d'au moins $10^6$ bactéries par ml.

TABLEAU 5

*Conservation par* Lactobacillus *d'une crème de levure chauffée*

| Agents apportés à la crème en plus de *L. plantarum* | | | Acide chlorhydrique | Acide acétique | Acide lactique | Formol | *B. cereus* + *Cl. sporogenes* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *Traitement :* g d'agent par litre ou *Contamination :* nombre de cellules/ml | | Témoin | 1 | 2 | 2 | 1 | *B. cereus* : $10^3$ *Cl. sporogenes* : $10^4$ |
| Caractéristiques des échantillons après 15 jours de conservation | pH | 3,9 | 3,0 | 3,0 | 3,2 | 5,4 | 3,0 |
| | *L. plantarum* cellules/ml | $10^6$ | $22 \cdot 10^6$ | $12 \cdot 10^5$ | $16 \cdot 10^4$ | < 1 | $76 \cdot 10^4$ |
| | *B. cereus* cellules/ml | — | — | — | — | — | $43 \cdot 10^2$ |

La crème de levure à 13 p. 100 de matières sèches est chauffée pendant 5 mn à 75°C et ensemencée après refroidissement avec *L. plantarum* à raison de $3 \cdot 10^2$ cellules/ml pour tous les essais. On ajoute ensuite, selon l'essai, un acide, du formol ou des bactéries de contamination (*B. cereus* et *Cl. sporogenes*). Température de conservation : 30°C.

En présence d'acide chlorhydrique (1 g/l), d'acide acétique (2 g/l), d'acide lactique (2 g/l), la multiplication de *L. plantarum* n'est nullement gênée malgré des pH respectivement de 3,0-3,0 et 3,2.

En présence de formol (1 g/l), nous n'avons pas trouvé de bactéries revivifiables.

Mais le fait remarquable est que, dans la crème contaminée par *B. cereus* et *Cl. sporogenes*, l'action de *L. plantarum* s'est révélée fort bénéfique. Bien que le nombre de germes contaminants soit resté constant, les mauvaises odeurs ne s'y révélèrent pas.

## DISCUSSION

Les essais qui ont été effectués montrent qu'il est possible de conserver la crème de levure en appliquant des techniques voisines de l'ensilage. Les agents chimiques les plus efficaces sont l'acide chlorhydrique à 1 g/l et le formol à 2 g/l. En associant les deux produits, on arrive à prolonger la conservation pendant deux mois.

Le nombre de levures vivantes diminue au cours de la conservation, principale-

ment en présence de formol. On obtient ainsi après deux semaines de conservation un produit ne contenant plus de levures vivantes et susceptible d'être donné aux animaux sans entraîner d'effets de dénutrition.

En présence du mélange acide chlorhydrique-formol, la recontamination de la crème de levure par des bactéries sporulées ne provoque pas d'altération. Le procédé d'ensilage des levures est donc sûr.

Pendant la conservation se produit une autolyse partielle qui est peut être le phénomène le plus gênant pour l'application pratique du procédé, puisque les protéines sont mieux utilisées que les acides aminés. Il sera donc peut être nécessaire de chauffer la crème de levure avant d'y ajouter les conservateurs chimiques.

Dans le cas de la levure chauffée, une conservation satisfaisante peut être obtenue en ensemençant la crème avec des lactobacilles qui se multiplient et abaissent le pH.

## CONCLUSION

Les résultats de ces essais faits sur un système modèle ont paru très encourageants. On a décidé d'appliquer la conservation par le mélange formol-acide chlorhydrique à des levures fourragères. Ces levures seront utilisées à l'alimentation de porcs après plusieurs mois de conservation.

*Reçu pour publication en décembre 1974.*

## SUMMARY


### PRESERVATION OF WET YEAST FOR ANIMAL FEEDING

In order to definite a process of preservation of wet yeast for animal feeding, a mean has been searched to prevent, in laboratory conditions at 30°C, the deterioration, by autolysis, of a suspension of yeast living cells (containing 13 per cent of dry materials).

By adding chemical agents such acetic, hydrochloric or propionic acid, or potassium metabisulfite or formaldehyde, it is possible to extend the preservation of the suspension of yeast cells during eight days. The agents the more effective are hydrochloric acid (1 g per liter) and formaldehyde (2 g per liter).

By combining them, it is possible to extend the preservation during two months and to reduce considerably the living cells number. There is a partial autolysis. Those agents induce an intensive releasing of the intracellular soluble phosphorus in the first twenty-four hours, when they are brought in high amounts (5 to 20 g per liter). With low amounts (1 g per liter), the releasing is of the same level as this induced by autolysis.

After having heated and cooled the yeast cells suspension, a good preservation has been obtained by adding per ml $10^2$ cells of *Lactobacillus plantarum* which lowers the pH from 4,5 to 3,9 by its growth. In the presence of this agent, the growth of *Bacillus cereus* and *Clostridium sporogenes*, germs of experimental contamination, could not be observed. Low amounts of the acids previously studied do not prevent the growth of the *Lactobacillus*. When the cells suspension is treated by formaldehyde, neither *Lactobacillus* nor the sporulated germs could be detected after ten days.

We shall use those results to preserve, by the mixture hydrochloric acid-formaldehyde, wet yeast which will be given to pig for feeding after several months of conservation.

## RESUMEN

### CONSERVACION DE CREMA DE LEVADURA PARA ALIMENTACION ANIMAL

Con objeto de definir un procedimiento de conservación de la levadura húmeda para la alimentación animal, se ha tratado de impedir, en laboratorio y a 30°C, la degradación por autolisis de una suspensión de células vivas de levaduras que contenían un 13 por 100 de sustancia seca.

Por adición de agentes químicos, como por ejemplo, los ácidos acético, clorhídrico o propiónico, o de metabisulfito de potasio o de aldehido fórmico, existe la posibilidad de conservar durante ocho días la suspensión de células de levadura. Los agentes más eficaces son el ácido clorhídrico (1 g por litro) y el formaldehido (2 g por litro).

Mediante su combinación, existe la posibilidad de prolongar durante dos meses la conservación y asimismo, de reducir considerablemente el número de células vivas. Se produce así una autólisis parcial. Con dosis elevadas (5 a 20 g por litro), estos agentes inducen una liberación del fósforo soluble intracelular durante las primeras veinticuatro horas. Con contenidos reducidos (1 g por litro), esta liberación es del mismo orden que aquélla provocada por la autólisis.

Tras calentamiento y enfriamiento de una suspensión de células de levaduras, se obtiene una correcta conservación por adición de *Lactobacillus plantarum* ($10^2$ células por ml), que, por su crecimiento, reduce el pH de 4,5 a 3,9. En presencia de este agente, el crecimiento de *B. cereus* y *Clostridium sporogenes* no puede ser observada. Las cantidas reducidas de los ácidos anteriormente mencionados no impiden el crecimiento de *Lactobacillus*. Cuando se procede al tratamiento de la suspensión de células por el formaldehido, no se puede descubrir al cabo de dize días, ni *Lactobacillus* ni gérmenes esporulados.

## RIASSUNTO

### CONSERVAZIONE DI CREMA DI LIEVITO PER L'ALIMENTAZIONE ANIMALE

Allo scopo di definire un procedimento di conservazione del lievito umido per l'alimentazione animale, si è cercato di impedire, in laboratorio a 30°C, la degradazione di una sospensione di cellule viventi di lieviti contenente 13 p. 100 di sostanza secca, mediante autolisi.

Aggiungendo degli agenti chimici quali l'acido acetico, cloridrico o propionico a del metabisolfito di potassio o d'aldeide formica, è possibile conservare durante otto giorno la sospensione di cellule di lievito. Gli agenti più efficaci sono l'acido cloridrico (1 g per litro) e la formaldeide (2 g per litro).

Combinando questi agenti, è possibile prolungare per una durata di due mesi la conservazione e di ridurre in modo considerevole il numero di cellule viventi. Si ha un'autolisi parziale. A dosi elevate (da 5 a 20 g per litro), questi agenti provocano una salatura del fosforo solubile intracellulare nelle prime ventiquattro ore. A dei tassi deboli (1 g per litro), la salatura è uguale a quella provocata dall'autolisi.

Dopo riscaldamento e raffreddamento di una sospensione di cellule di lieviti, si ottiene una buona conservazione aggiungendo del *Lactobacillus plantarum* ($10^2$ cellule per ml) che con la sua crescita abbassa il pH da 4,5 a 3,9. In presenza di questo agente, la crescita di *B. cereus* e *Clostridium sporogenes* non puo' essere osservata. Dei tassi deboli degli acidi precitati non impediscono la crescita di *Lactobacillus*.

Quando si tratta la sospensione di cellule mediante la formaldeide, non si puo' rilevare dopo un termine di dieci giorni nè *Lactobacillus* nè germi sporulati.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

CHARLOT G., 1961. *Dosages colorimétriques des éléments minéraux. Principes et méthodes.* Masson et Cie, Ed. Paris.

CORDONNIER R., 1966. Recherches sur l'amino-carboxypeptidase (dipeptidase) de *S. cerevisiae* var. *ellipsoideus*. *Ann. Technol. agric.*, **15**, n° hors série 1.

HOUGH J., MADDOX I., 1970. Yeast autolysis. *Process Biochem.*, **5**, 50.

RAFF W., 1967. Essais de laboratoire sur la conservation des levures de vin et de bière par voie chimique. *Przem. Ferment.*, 214.

VOSTI D., JOSLYN M., 1954. Autolysis of baker's yeast. *Appl. Microbiol.*, **2**, 70 et 79.

*Ann. Technol. agric.*, 1975, **24** (1), 47-64.

# ÉTUDE DE LA QUALITÉ DES VIANDES DE BOVIN

## I. — Étude biochimique de la maturation des viandes de taurillon

C. VALIN, Olga PALANSKA* et R. GOUTEFONGEA
avec la collaboration technique de C. Denoyer

*Station de Recherches sur la Viande,*
*Centre de Recherches de Clermont-Ferrand, I. N. R. A.,*
*Theix, 63110 Beaumont*

** Institut de Recherches zootechniques,*
*Leninovo NAM I, Nitra (Tchécoslovaquie)*

### RÉSUMÉ

Ce travail a pour but l'étude des mécanismes biochimiques de la maturation de la viande de taurillon et en particulier la connaissance de l'évolution *post mortem* de la tendreté. Cette recherche a été réalisée sur 8 animaux âgés de 17 à 18 mois et dont les poids de carcasse variaient de 250 à 310 kg.

Deux muscles ont été utilisés, le *Longissimus dorsi* et le *Pectoralis profundus*. Le contrôle de la maturation était effectué après 1, 3, 8 et 15 jours de stockage à + 5°C. Les déterminations ont porté sur l'évolution du pH, du pouvoir de rétention d'eau, de la teneur en matière sèche et de la tendreté pour les mesures physiques, et sur le plan biochimique sur les fractions azotées extractibles à faible et forte force ionique, les produits de dégradation (N aminé total, $NH_3$, déphosphorylation des nucléotides), les activités hydrolytiques libres, les fractions lipidiques et la lipolyse.

Les principaux résultats sont les suivants :

— l'évolution de la force de cisaillement met en évidence une importance relativement marquée du collagène dans le déterminisme de la dureté des muscles à cuisson rapide (*Longissimus dorsi*) chez ces animaux ;

— il existe une relation étroite entre les valeurs prises par le rapport $W/\sigma e$ et la solubilité myofibrillaire ;

— la relation entre l'activité cathepsine D libre et l'évolution des propriétés mécaniques du muscle cru est lâche et n'indique qu'une tendance ;

— la déphosphorylation des nucléotides est intense et rapide ; par contre, les autres fractions azotées non protéiques sont stables ;

— les lipides intramusculaires sont le siège d'une lipolyse intense au cours des premiers jours de conservation ; par contre les phénomènes d'oxydation restent limités.

D'une façon générale, la maturation semble se dérouler plus rapidement dans les viandes de taurillon que dans celles provenant de bovins adultes, sans toutefois que les viandes de taurillon puissent atteindre une plus grande tendreté.

Mots clés : *viande, bovin, maturation, tendreté, évolution* post mortem.

## INTRODUCTION

Dans un souci d'intensification de la production de viande bovine, l'élevage de jeunes bovins mâles abattus à un âge compris entre 12 et 20 mois s'est développé assez rapidement en France au cours de ces dernières années.

En dehors des avantages zootechniques que l'on peut reconnaître à ce type de production, ces animaux présentent un certain intérêt tant à l'abattage, par un rendement plus élevé, qu'à la découpe, par une composition corporelle plus favorable et mieux maîtrisée (teneur en gras) que celle de bovins adultes.

En revanche, le consommateur ne retrouve pas chez le taurillon toutes les qualités qu'il apprécie dans la viande de bœuf. Un certain nombre d'études (FIELD, 1971; REAGAN *et al.*, 1971) ont déjà mis en évidence certaines différences de qualités organoleptiques qui peuvent exister entre les viandes de taurillons et les viandes d'animaux castrés du même âge ou plus âgés. D'une façon générale, ces dernières sont préférées, sur le plan organoleptique, à celles des jeunes taureaux.

Nous avons donc entrepris l'étude des facteurs responsables du déterminisme de la qualité des viandes de taurillon. Dans une première étape, nous avons étudié les mécanismes biochimiques de la maturation et en particulier l'évolution *post mortem* de la tendreté. Cette étude constitue le premier volet d'un tryptique qui nous amènera par la suite à présenter l'étude comparée des qualités organoleptiques des viandes de femelles de réforme et de taurillons, puis l'examen des problèmes de couleur posés par les viandes de ces jeunes bovins.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### *Matériel animal*

Les 8 animaux ayant servi à l'étude étaient des taurillons de race *Normande* (5) et *Française Frisonne Pie Noire* (3), produits par la Station de Recherches sur l'Élevage des Ruminants, d'un âge compris entre 17 et 18 mois, ayant des poids de carcasses de 250 à 310 kg.

### *Techniques*

Les différentes déterminations ont été effectuées sur deux muscles de chaque animal, choisis en raison de leur différence de tendreté : le muscle *Pectoralis profundus* (*PP*) réputé dur et utilisé normalement en viande à bouillir, et le muscle *Longissimus dorsi* (*LD*), réputé tendre et utilisé en viande à rôtir ou à griller.

Vingt-quatre heures après l'abattage, un échantillon de muscle *Pectoralis profundus* d'environ 2 kg était prélevé, ainsi qu'un morceau de train de côtes comprenant les huitième, neuvième et dizième côtes. Chacun de ces prélèvements était divisé en 4 parties, dont 3 sensiblement égales et une de taille réduite. La série complète des déterminations était effectuée aussitôt sur un des 3 échantillons majeurs de chaque muscle, les deux autres échantillons étaient conservés à + 5°C, sous emballage aluminium, pendant respectivement 8 et 15 jours, périodes à l'issue desquelles les mêmes déterminations étaient effectuées. L'échantillon de taille réduite, conservé dans les mêmes conditions, était soumis à un nombre plus limité de mesures (tendreté et libération d'activité enzymatique cathepsine D) 3 jours *post mortem*.

Les déterminations effectuées étaient les suivantes.

I. *Mesures physiques.*

a) *pH :* déterminé au moyen d'un pHmètre portatif EIL 30 C muni d'une électrode duplex ;

b) *Pouvoir de rétention d'eau :* mesuré par la méthode de pression (GOUTEFONGEA, 1966) ;

c) *Teneur en matière sèche :* déterminée par passage à l'étuve à 102°C pendant 48 heures ;

d) *Tendreté :* déterminée avec l'appareil de SALE (1971) qui permet de mesurer la valeur $\sigma$ de la force maximum de cisaillement ainsi que le travail W dépensé au cours du cisaillement.

II. *Mesures biochimiques.*

a) *Fractions azotées extractibles :* une première extraction de 16 heures sur viande broyée est effectuée avec un tampon phosphate 0,04 M à pH 7,2. Le surnageant obtenu après centrifugation (5 000 *g* ; 20 mn ; 4°C) contient à la fois les protéines sarcoplasmiques et l'azote non protéique. Ce dernier est déterminé après traitement d'une aliquote de cet extrait à l'acide trichloracétique 10 p. 100, qui précipite les protéines sarcoplasmiques, et dosage de l'azote dans le surnageant. Par différence avec le dosage de l'azote dans l'extrait total, on obtient l'azote des protéines sarcoplasmiques.

L'insoluble au tampon phosphate est traité par la solution de Weber Edsall (KCl 0,6 M, pH 8,5) pendant 24 heures. Les protéines myofibrillaires sont solubilisées et séparées par centrifugation (20 000 *g* ; 1 h ; 4°C) et soumises au dosage de l'azote.

b) *Azote aminé total :* son dosage s'effectue par la méthode colorimétrique à la ninhydrine selon MOORE et STEIN (1954) sur un extrait à l'acide perchlorique après neutralisation.

c) $NH_3$ *:* son dosage s'effectue également sur un extrait PCA d'où on le déplace par le carbonate de lithium.

d) *Nucléotides :* leur état de dégradation est apprécié par la détermination d'un indice de déphosphorylation ainsi calculé : la densité optique à 253 nm d'un extrait à l'acide perchlorique, neutralisé puis filtré, est déterminée avant et après passage sur une colonne de Dowex I X8 équilibré sous la forme $HCOO^-$ ; comme seules les formes déphosphorylées ne sont pas retenues sur la colonne, le rapport $\frac{\text{DO éluat}}{\text{DO extrait total}}$ fournit la proportion de formes déphosphorylées par rapport aux nucléotides totaux (VALIN, CHARPENTIER, 1969).

e) *Libération des activités hydrolytiques :* les activités hydrolytiques totales sont déterminées sur le surnageant obtenu après homogénéisation du muscle dans une solution aqueuse de Triton X-100 à 0,2 p. 100, incubation à 37°C pendant 15 mn et centrifugation (5 000 *g* ; 20 mn ; 4°C).

Les activités hydrolytiques libres sont déterminées dans le jus extrait d'un échantillon de viande découpée et non broyée après macération dans une solution de saccharose 0,25 M à pH 7,4 et centrifugation à 160 000 *g* pendant 2 heures (VALIN, 1970).

L'activité hydrolytique est mesurée à pH 3,5 avec l'hémoglobine dénaturée comme substrat pour la cathepsine D et à pH 5 avec le phénolphtaléine βD-glucuronide (sel de Na) pour la β-glucuronidase.

f) *Lipides :* la teneur du muscle en lipides totaux est déterminée par la méthode de FOLCH *et al.* (1957). Les lipides totaux, en solution dans le chloroforme, sont séparés en phospholipides et lipides neutres par passage sur une colonne d'acide silicique et d'hyphlosupercel et élutions successives au chloroforme (lipides neutres) et au méthanol (phospholipides).

Les acides gras libres sont dosés dans la fraction lipides neutres par titration à la potasse alcoolique.

L'état d'oxydation des lipides totaux est apprécié directement sur un extrait à l'acide perchlorique, neutralisé, par détermination de l'indice d'acide 2 thiobarbiturique, selon TARLADGIS *et al.* (1964).

La composition en acides gras des phospholipides du muscle *Longissimus dorsi* à 1 et 15 jours *post mortem* a été déterminée par chromatographie en phase vapeur des esters méthyliques au moyen d'un chromatographe Girdel 75 CD/PT équipé de colonnes en inox de 1/8″ (3,2 mm) de diamètre, 3 mètres de long, remplies de butane-diol-succinate 20 p. 100 sur chromosorb W. A. W. 80/100 mesh. La chromatographie était réalisée à 195°C (isotherme).

## RÉSULTATS

### 1. — *Caractéristiques physiques*

1. 1. *pH, rétention d'eau et matière sèche.*

Le tableau 1 rapporte l'évolution, au cours de la maturation, des valeurs de pH, de capacité de rétention d'eau et de teneur en matière sèche des deux muscles étudiés.

Les animaux retenus pour cette étude avaient tous un pH musculaire normal, de l'ordre de 5,5, 24 heures *post mortem.*

TABLEAU 1

*Évolution du pH, de la teneur en matière sèche et de la capacité de rétention d'eau*

| Variables | | Temps *post mortem* 1 jour | 8 jours | 15 jours |
|---|---|---|---|---|
| pH | *LD* | 5,57 ± 0,19 | 5,54 ± 0,12 | 5,62 ± 0,14 |
| | *PP* | 5,59 ± 0,20 | 5,58 ± 0,13 | 5,58 ± 0,14 |
| Matière sèche | *LD* | 23,6 ± 0,6 | 23,6 ± 0,6 | 23,5 ± 1,1 |
| | *PP* | 22,8 ± 0,9 | 22,7 ± 1,1 | 22,6 ± 1,1 |
| CRE | *LD* | 21,4 ± 2,9 | 24,2 ± 3,4 | 22,1 ± 3,6 |
| | *PP* | 17,7 ± 2,2 | 25,2 ± 2,9 | 23,3 ± 4,3 |

*LD* : *Longissimus dorsi.*
*PP* : *Pectoralis profundus*
CRE : Capacité de rétention d'eau.

Au cours de cette expérimentation, nous n'avons pas noté d'évolution du pH ni de la teneur en matière sèche pendant la maturation.

Quant à la capacité de rétention d'eau, qui n'est pas affectée d'une façon significative dans le muscle *Longissimus dorsi,* elle décroît dans le muscle *Pectoralis profundus* surtout entre 1 et 8 jours *post mortem* (différence significative au seuil 1 p. 100) sans toutefois atteindre au bout de 8 jours des valeurs traduisant une altération importante de cette caractéristique.

Pour les deux muscles, nous n'observons pas l'évolution classique de la capacité de rétention d'eau au cours de la maturation telle que l'a décrite HAMM (1960), à savoir une augmentation progressive.

1. 2. *Propriétés mécaniques des muscles.*

Sur un muscle cru, la mesure de la force de cisaillement $\sigma$ et du travail correspondant W ainsi que la détermination du rapport $W/\sigma e$ du travail au produit de la force de cisaillement par l'épaisseur de l'échantillon permettent de suivre au cours de la

maturation l'évolution des deux principaux composants de la structure musculaire, le tissu conjonctif et les protéines myofibrillaires et d'avoir un bon indice de l'état de maturation (SALE, 1971).

Le tableau 2 rapporte l'évolution des valeurs de la force et du travail de cisaillement pour les deux muscles au cours de la maturation.

TABLEAU 2

*Évolution de la force et du travail de cisaillement dans le muscle* Pectoralis profundus *et le muscle* Longissimus dorsi *au cours de la maturation*

| | | 1 jour | 3 jours | 8 jours | 15 jours |
|---|---|---|---|---|---|
| σ (kg) | *LD* | 2,06 ± 0,37 | 1,76 ± 0,39 | 1,94 ± 0,33 | 2,02 ± 0,37 |
| | *PP* | 4,07 ± 0,62 | 3,74 ± 0,67 | 4,59 ± 0,50 | 4,55 ± 0,51 |
| W (cm kg) | *LD* | 1,06 ± 0,32 | 0,65 ± 0,11 | 0,56 ± 0,17 | 0,59 ± 0,18 |
| | *PP* | 1,76 ± 0,45 | 1,20 ± 0,32 | 1,17 ± 0,22 | 1,19 ± 0,29 |

Les valeurs de W et σ (moyenne ± écart-type) sont rapportées à une section de 1 cm².

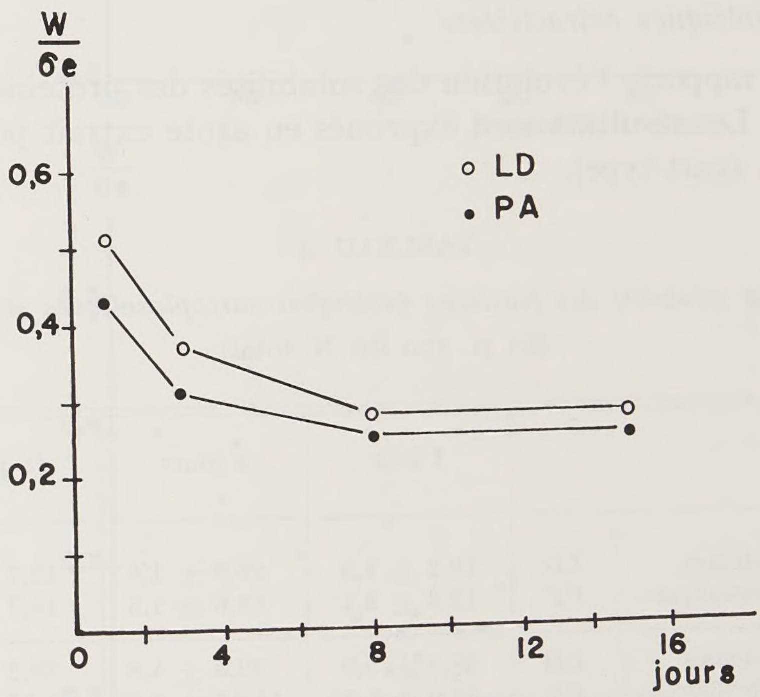



FIG. 1. — *Évolution du rapport W/σe au cours de la maturation dans le muscle* Longissimus dorsi *et le muscle* Pectoralis profundus

On constate une diminution progressive du travail de cisaillement jusqu'au huitième jour, alors que la force de cisaillement reste constante, voire augmente légèrement dans le cas du muscle *Pectoralis profundus*. Ces résultats corroborent globalement ceux enregistrés précédemment sur des animaux castrés plus âgés (SALE, VALIN, 1970).

Le rapport W/σe évolue comme la valeur de W et décroît très vite en début de maturation puis est pratiquement stable à partir du huitième jour (fig. 1). Le tableau 3

rapporte les seuils de signification des différences enregistrées pour les valeurs prises par ce coefficient aux différents temps de la maturation.

Dans nos conditions expérimentales, la majeure partie des transformations qui affectent les propriétés mécaniques des deux muscles étudiés interviennent au cours des trois premiers jours *post mortem*.

TABLEAU 3

*Seuil de signification des différences prises par le coefficient W/σe à différents temps de maturation*

| Différences (jours) | Seuils de signification | |
|---|---|---|
| | *Longissimus dorsi* | *Pectoralis profundus* |
| 1-3 | 0,001 | 0,001 |
| 3-8 | 0,05 | 0,05 |
| 3-15 | 0,02 | 0,05 |
| 8-15 | NS | NS |

## 2. — *Caractéristiques biochimiques*

### 2. 1. *Fractions protéiques extractibles.*

Le tableau 4 rapporte l'évolution des solubilités des protéines sarcoplasmiques et myofibrillaires. Les résultats sont exprimés en azote extrait pour cent de l'azote total (moyenne + écart-type).

TABLEAU 4

*Évolution de la solubilité des fractions protéiques sarcoplasmiques et myofibrillaires*
(en p. 100 du N total)

| | | 1 jour | 8 jours | 15 jours |
|---|---|---|---|---|
| Protéines sarcoplasmiques | *LD* | 19,2 ± 1,5 | 20,9 ± 1,6 | 19,7 ± 2,2 |
| | *PP* | 19,8 ± 2,1 | 18,6 ± 1,5 | 18,7 ± 2,4 |
| Protéines myofibrillaires | *LD* | 38,8 ± 5,9 | 39,3 ± 4,8 | 39,2 ± 4,9 |
| | *PP* | 32,0 ± 5,5 | 44,1* ± 6,9 | 43,6* ± 3,1 |

* Différences de solubilité 1-8 jours et 1-15 jours significatives au seuil 1 p. 100.

Nous n'avons pas enregistré d'évolution significative de la solubilité des protéines sarcoplasmiques dans les deux muscles étudiés. Les protéines myofibrillaires présentent une évolution de leur solubilité conforme au schéma classique, à savoir une augmentation progressive au cours de la maturation, au moins pendant les huit premiers jours.

Toutefois, nous constatons que l'augmentation de solubilité testée sur les moyennes n'est hautement significative (seuil 1 p. 100) que dans le cas du muscle *Pectoralis profundus*. Compte tenu de nos résultats antérieurs (SALE et VALIN, 1970 ; VALIN et PINKAS, 1971), nous avons cherché à préciser s'il existait une relation entre l'évolution de la solubilité myofibrillaire et celle du rapport W/$\sigma e$ au cours de la maturation.

La figure 2 révèle l'existence de deux populations de points selon que les valeurs prises par le rapport W/$\sigma e$ sont supérieures ou inférieures à 0,5.

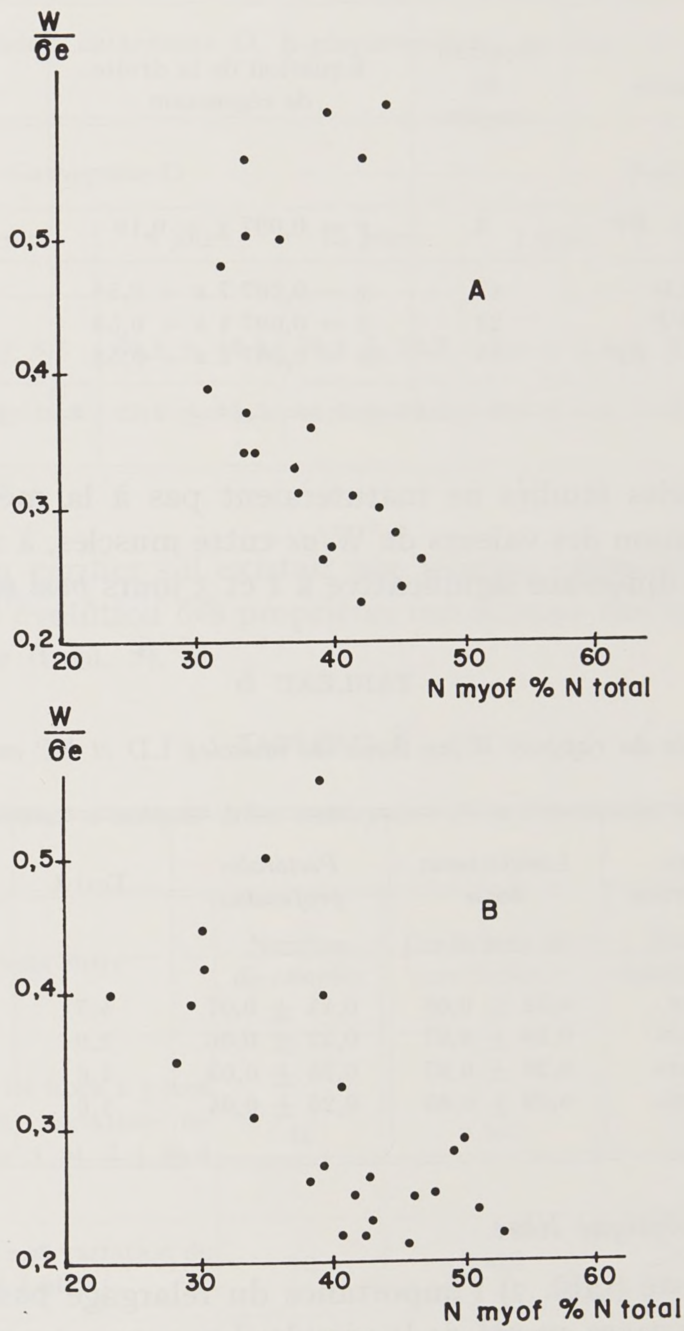



FIG. 2. — *Relation entre le rapport W/σe et la solubilité des protéines myofibrillaires*
A : *Longissimus dorsi*
B : *Pectoralis profundus*

Pratiquement, à deux exceptions près, les valeurs de W/$\sigma e$ supérieures à 0,5 correspondent au muscle *Longissimus dorsi* et toutes ont été observées 1 jour *post mortem*. Si on sépare les deux populations, on constate à l'intérieur de chacune d'elles une corrélation étroite entre les valeurs de W/$\sigma e$ et la solubilité myofibrillaire (tabl. 5).

Le fait que, selon la valeur de $W/\sigma e$ (supérieure ou inférieure à 0,5) le coefficient de corrélation change de signe, pourrait indiquer que pour $W/\sigma e$ supérieur à 0,5 les muscles sont en condition *ante rigor mortis*.

TABLEAU 5

*Relation entre les valeurs prises par le rapport* $W/\sigma e$ *et la solubilité myofibrillaire en fonction du temps de maturation*

| $W/\sigma e$ | Muscle | Nombre de couples | Équation de la droite de régression | $r$ | Seuil de signification de $r$ (%) |
|---|---|---|---|---|---|
| $W/\sigma e > 0,5$ | *LD + PP* | 8 | $y = 0,097\,x + 0,10$ | 0,82 | 2 |
| $W/\sigma e < 0,5$ | *LD* | 17 | $y = 0,007\,7\,x + 0,59$ | — 0,59 | 2 |
| | *PP* | 22 | $y = 0,007\,1\,x + 0,58$ | — 0,75 | 1 |
| | *LD + PP* | 39 | $y = 0,007\,2\,x + 0,58$ | — 0,71 | 1 |

Les deux muscles étudiés ne matureraient pas à la même vitesse. D'ailleurs (tabl. 6) la comparaison des valeurs de $W/\sigma e$ entre muscles, à même temps de maturation, indique une différence significative à 1 et 3 jours *post mortem*.

TABLEAU 6

*Évolution comparée du rapport* $W/\sigma e$ *dans les muscles* LD *et* PP *en cours de maturation*

| Temps *post mortem* | *Longissimus dorsi* | *Pectoralis profundus* | Test $t$ | Seuil de signification |
|---|---|---|---|---|
| 1 jour | 0,52 ± 0,08 | 0,44 ± 0,07 | 4,7 | 5 ‰ |
| 3 jours | 0,38 ± 0,07 | 0,32 ± 0,06 | 2,9 | 5 % |
| 8 jours | 0,29 ± 0,07 | 0,26 ± 0,03 | 1,6 | NS |
| 15 jours | 0,29 ± 0,05 | 0,26 ± 0,04 | 1,6 | NS |

2. 2. *Activité hydrolytique libre.*

Nous avons testé (tabl. 7) l'importance du relargage *post mortem* des enzymes de type lysosomal actives au pH de la viande. Les mesures ont été effectuées sur les activités cathepsine D (EC 3, 4, 4, 23), protéase majeure du tissu musculaire et β-glucuronidase (EC 3, 2, 1, 31), active sur les mucopolysaccharides du tissu conjonctif. Les résultats sont exprimés en pour cent de l'activité totale de l'enzyme considérée.

Ces valeurs indiquent, d'une part, le niveau d'activité libre de la cathepsine D relativement important et d'autre part elles montrent que la majeure partie du relargage s'est opérée au cours du premier jour *post mortem*. En effet les augmentations au-delà du premier jour sont relativement faibles et non significatives sauf pour le *Longissimus dorsi* (significatif au seuil 5 p. 100).

En ce qui concerne l'activité β-glucuronidase, on retrouve un résultat analogue à celui observé dans les mêmes conditions chez des animaux plus âgés. Le relargage s'opère entre le premier et le huitième jour de maturation (différences significatives au seuil de 1 et 5 p. 100 respectivement pour le *Longissimus dorsi* et le *Pectoralis profundus*), mais le niveau d'activité libre demeure très faible puisqu'il atteint à peine 10 p. 100 de l'activité totale 15 jours *post mortem*.

TABLEAU 7

*Évolution des activités cathepsine D, β-glucuronidase, au cours de la maturation*

| | Cathepsine D | | | | β-glucuronidase | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 jour | 3 jours | 8 jours | 15 jours | 1 jour | 8 jours | 15 jours |
| *LD* | 32,9 ± 10,0 | 43,8 ± 8,8 | 36,8 ± 12,1 | 39,1 ± 18,9 | 3,3 ± 2,1 | 9,8 ± 3,5 | 10,3 ± 3,4 |
| *PP* | 31,3 ± 13,2 | 36,5 ± 16,4 | 35,1 ± 15,7 | 41,3 ± 19,2 | 2,8 ± 1,2 | 7,1 ± 4,6 | 7,9 ± 3,7 |

Nous avons voulu vérifier s'il existait une relation entre les niveaux d'activité cathepsine D libre et l'évolution des propriétés mécaniques des muscles caractérisées par le coefficient $W/\sigma e$ (tabl. 8).

TABLEAU 8

*Relation entre les niveaux d'activité libre cathepsine D et l'évolution du coefficient* $W/\sigma e$

| Relations entre | Nombre de couples | Coefficient de corrélation *r* | Seuil de signification *r* |
|---|---|---|---|
| P. 100 activité libre 1 j *post mortem* et variation de $W/\sigma$ entre 1 et 3 j *post mortem* | 16 | 0,407 | NS |
| Activité libre et variation de $W/\sigma$ entre 1 et 3 j | 16 | 0,433 | 0,10 |
| Activité libre moyenne et variation de $W/\sigma$ entre 1 et 8 j | 16 | 0,465 | 0,10 |

S'il existe une corrélation, elle n'est pas très étroite, puisque environ 20 p. 100 seulement de la variation de $W/\sigma e$ seraient associés au niveau d'activité libre cathepsine D, et ceci ne traduirait qu'une tendance (P = 0,10).

2. 3. *Fractions azotées non protéiques.*

Leur étude permet d'apprécier l'évolution de l'azote non protéique en général, des produits de dégradation des protéines (azote aminé et ammoniaque) et enfin de suivre la cinétique de déphosphorylation des nucléotides, ce qui dans cette période de l'évolution *post mortem* revient pratiquement à mesurer la disparition de l'IMP [1]. Le tableau 9 résume ces résultats.

TABLEAU 9

*Évolution des fractions azotées non protéiques au cours de la maturation*

| | *Longissimus dorsi* | | | *Pectoralis profundus* | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 jour | 8 jours | 15 jours | 1 jour | 8 jours | 15 jours |
| Azote non protéique p. 100 de l'azote total | 12,4 ± 2,2 | 11,9 ± 1,5 | 12,1 ± 1,8 | 11,4 ± 0,8 | 12,2 ± 1,4 | 12,4 ± 0,6 |
| $NH_3$ libre mg/100 g de tissu frais | 18,8 ± 2,2 | 20,2 ± 2,8 | 20,4 ± 1,5 | 19,7 ± 2,5 | 20,7 ± 2,5 | 20,0 ± 2,8 |
| Pourcentage de déphosphorylation des nucléotides | 24,2 ± 8,0 | 44,5 ± 8,7 | 63,0 ± 8,1 | 15,0 ± 10,5 | 51,3 ± 13,9 | 66,2 ± 7,4 |
| Azote aminé mM pour 100 g de tissu frais | 7,9 ± 5,9 | 11,3 ± 7,5 | 11,6 ± 5,8 | 9,8 ± 5,9 | 11,6 ± 6,7 | 11,4 ± 4,8 |

| Seuils de signification des différences | | 1-8 j | 1-15 j | 8-15 j |
|---|---|---|---|---|
| Azote protéique | *LD, PP* | NS | NS | NS |
| Ammoniac | *LD, PP* | NS | NS | NS |
| Azote aminé | *LD, PP* | NS | NS | NS |
| Déphosphorylation des nucléotides | *LD*<br>*PP* | 1 ‰<br>1 ‰ | 1 ‰<br>1 ‰ | 1 ‰<br>2 ‰ |

On peut constater une bonne stabilité de la fraction azotée non protéique, une tendance à l'augmentation du $NH_3$ libre et de l'azote aminé, sans toutefois que les écarts soient significatifs. La déphosphorylation des nucléotides est intense et rapide.

(1) IMP : acide inosinique.

2. 4. *Fractions lipidiques intramusculaires.*

L'analyse de l'évolution subie par les fractions lipidiques intramusculaires montre qu'elles sont le siège d'une lipolyse intense, surtout au cours des huit premiers jours de conservation (tabl. 10). Par contre, aucune oxydation importante n'a été observée au cours de la même période, le test de l'acide thiobarbiturique ne révélant que des traces de malonaldéhyde, non quantifiables par la technique mise en œuvre.

TABLEAU 10

*Évolution des fractions lipidiques intra-musculaires*

| | *Longissimus dorsi* | | | *Pectoralis profundus* | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1 jour | 8 jours | 15 jours | 1 jour | 8 jours | 15 jours |
| Lipides totaux en p. 100 du poids de muscle frais | 1,8 ± 0,5 | 1,4 ± 0,7 | 1,5 ± 0,5 | 1,3 ± 0,2 | 1,3 ± 0,1 | 1,2 ± 0,3 |
| Triglycérides et acides gras libres en p. 100 des lipides totaux | 53,9 ± 11,8 | 59,9 ± 20,9 | 55,8 ± 11,6 | 39,8 ± 10,6 | 42,4 ± 11,7 | 44,4 ± 13,7 |
| Phospholipides en p. 100 des lipides totaux | 30,2 ± 10,2 | 34,6 ± 14,3 | 38,2 ± 11,1 | 46,2 ± 12,5 | 45,6 ± 9,3 | 47,0 ± 10,1 |
| Acides gras libres en mg acide palmitique par g de lipide | 7,4 ± 3,2 | 20,9 ± 11,6 | 27,6 ± 9,4 | 11,6 ± 3,9 | 26,6 ± 12,3 | 50,2 ± 28,7 |

Seuil de signification des différences des teneurs en acides gras libres au cours de la maturation :
1-8 jours : 2,5 p. 100
1-15 jours : 1 p. 100 *LD*
2,5 p. 100 *PP*
8-15 jours : NS

Enfin, sur quatre animaux, l'étude de la composition en acides gras des phospholipides à 1 jour et 15 jours *post mortem* ne révèle aucune évolution (tabl. 11) des constituants de cette fraction.

## DISCUSSION ET CONCLUSION

Tous les animaux étudiés au cours de cette expérimentation avaient des pH musculaires normaux 24 heures *post mortem*. Ce point est important à noter, car chez les taurillons la fréquence des installations de *rigor mortis* avec des pH musculaires égaux ou supérieurs à 6 est relativement élevée. En Angleterre, McDougall et Rhodes (1972) ont enregistré des fréquences de l'ordre de 30 p. 100 de ces *rigor mortis*

TABLEAU II

*Composition en acides gras des phospholipides du muscle* Longissimus dorsi

| N° animaux | Race | Muscle | Jours *post mortem* | Somme de : C14 R, C14 : 0, C14 : 1, C15 R, C15 : 0 | C16 R | C16 : 0 | C16 : 1 | C17 : 0 | C17 : 1 C18 R | C18 : 0 | C18 : 1 | C18 : 2 | C20 R | C21 : 1 | C22 R |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| I | *FFPN* | *LD* | 1 | 5,60 | 3,36 | 19,22 | 1,49 | 0,56 | 1,03 | 14,46 | 20,71 | 25,19 | 2,15 | 2,05 | 4,20 |
| | | *LD* | 15 | 5,57 | 3,72 | 18,21 | 1,49 | 0,67 | 1,39 | 14,49 | 19,60 | 25,55 | 2,86 | 1,76 | 4,69 |
| III | *Norm.* | *LD* | 1 | 6,83 | 3,19 | 20,14 | 1,95 | 0,53 | 0,62 | 18,72 | 21,30 | 20,32 | 2,66 | 0,44 | 3,28 |
| | | *LD* | 15 | 6,63 | 3,61 | 19,62 | 2,07 | 0,60 | 1,20 | 14,89 | 18,41 | 24,35 | 3,96 | 1,38 | 3,27 |
| IV | *Norm.* | *LD* | 1 | 4,46 | 2,68 | 18,21 | 2,05 | 0,16 | 1,03 | 14,31 | 23,39 | 29,83 | 0,61 | 0,54 | 2,73 |
| | | *LD* | 15 | 4,45 | 2,86 | 19,85 | 2,04 | 0,16 | 0,95 | 14,95 | 22,96 | 28,18 | 0,38 | 0,64 | 2,58 |
| VI | *Norm.* | *LD* | 1 | 4,25 | 2,58 | 20,58 | 2,55 | 0,25 | 0,94 | 15,73 | 28,63 | 21,71 | 0,16 | 0,19 | 2,42 |
| | | *LD* | 15 | 4,45 | 2,46 | 23,47 | 1,86 | 0,30 | 0,89 | 14,75 | 29,24 | 20,26 | 0,19 | 0,21 | 1,91 |

anormales avec des animaux âgés d'environ 12 mois. Nous mêmes avons pu observer, sur un effectif de plus de quatre cents taurillons âgés de 14 à 18 mois et abattus au cours des deux dernières années à l'abattoir du C. R. Z. V. de Theix, des résultats analogues. Lorsque les animaux présentent cette anomalie, la maturation est perturbée et la conservation de la viande devient très aléatoire.

Dans les conditions normales, le fait majeur de la maturation des viandes de bovin est une augmentation progressive de la tendreté ; c'est pourquoi nous avons mis plus spécialement l'accent sur l'étude du déterminisme de cette caractéristique organoleptique.

L'analyse de l'évolution des propriétés mécaniques des muscles *post mortem* permet de préciser les transformations qui surviennent au niveau des différents constituants de la structure musculaire à ces instants (SALE, 1971).

Dans cette étude, nous avons pu constater que la force de cisaillement restait constante, voire augmentait, au cours de la maturation aussi bien dans un muscle dur comme le *Pectoralis profundus* que dans un muscle tendre comme le *Longissimus dorsi*. Sur ce point, le comportement de la viande de taurillon est différent de ce que l'on a pu enregistrer sur des animaux plus âgés (vaches de réforme, bœufs traditionnels), pour lesquels on enregistre une diminution de la force de cisaillement au cours de la maturation (SALE et VALIN, 1970). Ainsi dans le cas des taurillons mâles non castrés, le collagène joue un rôle important dans le déterminisme de la dureté de muscles normalement tendres. Ce résultat corrobore ceux de DUMONT (1971) et BUTCHER (1971) qui ont montré que les muscles tendres de la carcasse de jeunes bovins étaient plus durs que les muscles correspondants d'animaux plus âgés, vaches de réforme, bœufs et génisses.

Le travail de cisaillement diminue au cours de la maturation ; ce phénomène est général et s'observe aussi bien au niveau des muscles tendres à cuisson rapide que pour les muscles durs. Nous avions émis l'hypothèse (SALE et VALIN, 1970) que l'évolution de ce paramètre était fonction des transformations qui surviennent au niveau des protéines myofibrillaires pendant cette période, l'augmentation de la solubilité se traduisant par une diminution du rapport du travail à la force de cisaillement. HEGARTY *et al.* (1963) ont montré l'existence d'une relation positive entre la solubilité myofibrillaire et la tendreté. Par contre, GOLL *et al.* (1964) concluaient qu'il n'y avait pas de relation entre les solubilités myofibrillaires et la tendreté mesurée avec l'appareil de Warner-Bratzler. Ces derniers comparaient la tendreté de muscles qui maturaient sur la carcasse avec celle de muscles prélevés aussitôt après l'abattage et qui étaient le siège d'une contraction importante ; alors qu'il n'y avait pas de différence de solubilité entre les deux types de muscles, ceux qui maturaient sur la carcasse étaient toujours plus tendres. Cependant il convient de préciser que la solubilité était mesurée au moyen d'extractions effectuées selon la méthode de Helander (IK, 1,1 M) et il est bien connu que ces conditions permettent l'extraction pratiquement totale des protéines myofibrillaires quel que soit le stade d'évolution *post mortem*, car IK entraîne la dépolymérisation de l'actine. ABERLE et MERKEL (1966) les premiers trouvent une corrélation entre l'évolution de la solubilité myofibrillaire *post rigor mortis* et l'augmentation de tendreté mesurée avec l'appareil de Warner-Bratzler. Ces auteurs ont travaillé sur des animaux âgés, vaches de 6-8 ans, bœufs et génisses de 24 mois et ils ont observé que 30 p. 100 de la variabilité de la tendreté était imputable à l'évolution myofibrillaire entre le premier et le septième jour *post mortem*, ce chiffre s'élevant à 67 p. 100 entre le septième et le quatorzième jour.

Dans nos conditions expérimentales, nous avons pu mettre en évidence qu'il y avait, au cours des transformations *post mortem*, une relation étroite et significative entre l'évolution de la solubilité myofibrillaire et la variation du rapport $W/\sigma e$ déterminé sur le muscle cru, ce qui confirme nos hypothèses antérieures. De plus, dans le cas des taurillons, il apparaît bien que ces transformations s'opèrent assez rapidement après l'abattage puisque entre le huitième et le quinzième jour on n'enregistre plus de variation ni du rapport $W/\sigma e$ ni de la solubilité myofibrillaire et que la majeure partie de l'évolution des propriétés mécaniques des deux muscles étudiés s'opère entre 1 et 3 jours *post mortem*.

Mais ces résultats soulignent bien que le rapport $W/\sigma e$ ne constitue pas une mesure de la tendreté de la viande telle que l'apprécie le consommateur puisque pour les deux muscles étudiés ce rapport prend des valeurs égales aux différents temps de maturation. Par contre, il se confirme que ce rapport permet effectivement de préciser les parts respectives des transformations subies par les constituants de la structure du muscle. Le coefficient de corrélation calculé entre les valeurs de $W/\sigma e$ et celles de la solubilité myofibrillaire indique que près de 50 p. 100 de la variabilité du rapport échappent aux modifications de la myofibrille, du moins vues à travers le critère de solubilité. Peut-être sous-estimons nous l'ampleur des transformations subies par l'appareil contractile. Mais par ailleurs, s'il est bien admis qu'au cours de cette période *post mortem* le collagène n'évolue pas (constance de la force de cisaillement) au point d'influer sur la tendreté de la viande, on peut se demander si le tissu conjonctif considéré globalement (et non plus à travers son constituant majeur, le collagène) ne serait pas le siège de certaines transformations qui pourraient modifier lors des opérations de cisaillement les relations entre le milieu myofibrillaire et les enveloppes conjonctives en facilitant l'écoulement du contenu myofibrillaire lors de la phase de compression qui précède le cisaillement proprement dit (SALE, 1971) ; ceci reste à démontrer.

Enfin, nos mesures de solubilité en relation avec les caractéristiques de cisaillement du muscle cru nous conduisent à observer une évolution du même type que celle déjà rapportée par KHAN et VAN DER BERG (1964) ainsi que par FUJIMAKI *et al.* (1965) alors que ces auteurs retraçaient l'évolution de la solubilité en fonction du temps *post mortem*. Ceci tendrait à confirmer que pour des valeurs du rapport $W/\sigma e$ supérieures à 0,5 on se trouve en condition de solubilité *ante rigor mortis*, condition pour laquelle ces auteurs ont montré que la solubilité est bien supérieure à celle mesurable en pleine *rigor*.

On peut s'interroger sur la nature des mécanismes responsables de ces transformations. Il est bien établi qu'il n'y a pas de relation entre l'accroissement de la tendreté et une protéolyse conduisant à l'accumulation d'acides aminés libres. En général, l'augmentation de la quantité d'acides aminés libres se produit bien après la phase d'augmentation de la tendreté (DAVEY et GILBERT, 1966).

Dans une étude antérieure (KOPP et VALIN, 1971) nous avions montré que l'incubation, au pH de la viande, de myofibrilles préparées *post rigor mortis* avec de la cathepsine D purifiée, entraînait une modification de la solubilité myofibrillaire comparable à celle que l'on peut observer au cours de la maturation.

Au cours de la présente expérimentation nous avons vu que, associée à des taux d'activité cathepsine D libre supérieurs à ceux que l'on peut mesurer chez des bovins adultes, la vitesse de la maturation était également supérieure à celle présentée par

ces derniers animaux. Il apparaît également qu'il doit exister une relation positive entre la diminution du rapport W/σe et les niveaux d'activité libre. La corrélation n'est pas très étroite et à la limite du seuil de signification, mais il convient de noter que la relation est établie d'une part sur un nombre limité d'échantillons et d'autre part pour la seule activité lysosomale cathepsine D. Au cours de la même période, le relargage de l'activité glucuronidase s'opère parallèlement à l'évolution de W/σe. Tout ceci concourt à indiquer qu'il doit bien exister une relation entre les niveaux d'activité libre *post mortem* et l'évolution des propriétés mécaniques de muscle. Mais cette relation n'est pas simple et, comme nous l'avions fait remarquer précédemment, il est difficile de la ramener à une simple action protéolytique (SALE, VALIN, 1969).

En dehors des aspects relatifs à la tendreté, nous pouvons constater également une accélération des autres réactions caractéristiques de la phase de maturation tant au niveau de la déphosphorylation des nucléotides que de l'évolution de la fraction des lipides intramusculaires. La déphosphorylation des nucléotides acidosolubles est très rapide puisque après huit jours de maturation nous observons des pourcentages de formes déphosphorylées du même ordre de grandeur que ceux observés après quinze jours de maturation chez les bovins adultes (VALIN, CHARPENTIER, 1969). Quant à l'évolution des fractions lipidiques, nos résultats corroborent bien ceux de HOOD et ALLEN (1971) qui ont observé également une vitesse de lipolyse supérieure chez le taurillon à celle mesurable sur carcasses de bœufs et de génisses. Comme ces auteurs, nous n'avons pas enregistré d'évolution quantitative ou qualitative des phospholipides, ce qui confirme bien que durant la période étudiée l'autoxydation demeure très faible et que la majeure partie des transformations affecte la fraction des lipides neutres.

En conclusion, il s'avère donc que les taurillons présentent des caractéristiques de maturation un peu différentes de celles des bovins plus âgés. Il se confirme que, sur le plan de la tendreté absolue, ces animaux ne permettent pas d'obtenir des viandes plus tendres, du moins dans les parties nobles comme le faux filet, que celles issues de production plus traditionnelle. Par contre, l'aptitude à maturer plus rapidement, ainsi que le rapporte également DUMONT (1974), peut être un facteur positif dans le cadre pratique des circuits de distribution moderne de la viande. Mais, par ailleurs, cette accélération des phénomènes de la maturation, aux températures de stockage communément utilisées, est peut-être la cause de la réputation de fragilité que les professionnels s'accordent à reconnaître aux viandes de ces types d'animaux.

*Reçu pour publication en décembre 1974.*

## SUMMARY


### STUDY OF THE QUALITY OF CATTLE MEAT.
### I. — BIOCHEMICAL STUDY OF THE AGING OF YOUNG BULL MEAT

This research deals with the biochemistry of the aging of young bull meat with a special emphasis on the *post mortem* changes of tenderness.

The work was performed on eight young bulls slaughtered at a live weight of 250-310 kgs when they were 17 to 18 months old.

Two muscles were used, the *Longissimus dorsi* and the *Pectoralis profundus*. The aging changes were checked after 1, 3, 8 and 15 days of storage at + 5°C, through the measurements of the pH, the water holding capacity, the amount of dry matter, the physical assessment of tenderness, the extractibility of the sarcoplasmic and myofibrillar proteins, the total amino nitrogen and $NH_3$, the dephosphorylation rate of acid soluble nucleotids, the release of hydrolytic enzymes and the lypolysis.

The main results are :

— a close correlation between the changes of myofibrillar protein solubility and the ratio $W/\sigma e$ ;

— a relatively high contribution of the collagen in the determinism of the toughness of the *Longissimus dorsi* muscle ;

— a fairly poor correlation between the level of free cathepsin D activity and the increase of tenderness ;

— a rapid dephosphorylation of acid soluble nucleotids, but others non protein nitrogen fractions are stable ;

— the lipolytic activity is very high but the oxydation process is very low.

Generally speaking, the aging changes in the young bull meat occur faster than in the meat of older animal without any improvement of the ultimate tenderness of this meat.

## RESUMEN

### ESTUDIO DE LA CALIDAD DE LAS CARNES DE BOVINOS.
### I. — ESTUDIO BIOQUÍMICO DE LA MADURACIÓN DE LAS CARNES DE NOVILLOS

Este trabajo tiene por objeto estudiar los mecanismos bioquímicos de la maduración de la carne de novillo y, en particular, el conocimiento de la evolución *post mortem* de la ternura cárnica. Esta investigación ha sido llevada a cabo mediante ocho animales de 17 a 18 meses de edad, y cuyo peso de canal ha oscilado entre 250 y 310 kg.

Han sido utilizados dos músculos, el *Longissimus dorsi* y el *Pectoralis profundus*. El control de la maduración se ha llevado a cabo después de transcurridos 1, 3, 8 y 15 días de almacenamiento a + 5°C. Las determinaciones se han referido a la evolución del pH, del poder de retención de agua, el contenido en materia seca y la ternura cárnica por lo que se refiere a las mediciones físicas ya desde el punto de vista bioquímico, respecto a las fracciones nitrogenadas extraibles en reducida y fuerte fuerza iónica, los productos de degradación (N aminado total, $NH_3$, desfosforilación de los nucleotidos), las actividades hidrolíticas libres, las fracciones lipídicas y la lipólisis.

Los principales resultados han sido los siguientes :

— la evolución de la fuerza de cizallamiento hace resaltar una importancia relativamente pronunciada del colageno en la determinación de la dureza de los músculos con cocción rápida (*Longissimus dorsi*) en el caso de estos animales ;

— La relación entre la actividad catepsina D libre y la evolución de las propiedades mecánicas del músculo crudo es vaga y únicamente indica una tendencia ;

— la desfosforilación de los nucleótidos es tan intensa como rápida ; por el contrario, las demás fracciones no proteicas son estables ;

— los lípidos intramusculares son la sede de una lipólisis intensa durante el transcurso de los primeros días de conservación. Por el contrario, los fenómenos de oxidación permanecen limitados.

De forma general, la maduración parece desarrollarse con mayor rapidez en las carnes de novillo que el las carnes procedentes de bovinos adultos, pero sin que por ello las carnes de novillo puedan llegar a alcanzar una mayor ternura cárnica.

## RIASSUNTO

### STUDIO DELLA QUALITÀ DELLA CARNE BOVINA.
### I. — STUDIO BIOCHIMICO DELLA MATURAZIONE DELLA CARNE DI GIOVANI TORI

La scopo di questa ricerca è lo studio dei meccanismi biochimici della maturazione della carne di giovani tori e in particolare l'esame dell'evoluzione della tenerezza *post mortem*. Questo studio è stata effettuato su 8 animali di 17-18 mesi e le cui carcasse pesavano tra 250 e 310 kg.

Sono stati scelti due muscoli, il *Longissimus dorsi* e il *Pectoralis profundus*. Il controllo della maturazione è stato effettuato dopo 1, 3, 8 e 15 giorni di stoccaggio a + 5°C. Gli elementi da determinare erano rispettivamente ; — per le misure fisiche : l'evoluzione del pH, il potere di ritenzione d'acqua, il tenore di materia secca e della tenerezza ; — sul piano biochimico : le frazioni azotate estraibili in debole e forte forza ionica, i prodotti di degradazione (N amminato totale, $NH_3$, defosforilazione dei nucleotidi), le attività idrolitiche libere, le frazioni lipidiche e la lipolisi.

I principali risultati sono i seguenti :

— l'evoluzione della forza di taglio evidenzia l'importanza relativamente marcata del collagene nella determinazione della durezza dei muscoli a cottura rapida (*Longissimus dorsi*) in questi animali.

— Esiste una stretta relazione tra i valori assunti dal rapporto W/σ e e la solubilità miofibrillare ;

— La relazione tra l'attività catepsine D libera e l'evoluzione delle proprietà meccaniche del muscolo crudo è vaga e indica soltanto una tendenza ;

— La defosforilazione dei nucleotidi è intensa e rapida ; le altre frazioni azotate non proteiche sono invece stabili ;

— I lipidi intramuscolari sono la sede di una lipolisi intensa durante i primi giorni di conservazione. I fenomeni d'ossidazione restano invece limitati.

In linea generale, sembra che la maturazione si sviluppa più rapidamente per la carne di giovani tori che per quella di bovini adulti senza tuttavia che la carne di giovani tori possa raggiungere una più grande tenerezza.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES


ABERLE E. D., MERKEL R. A., 1966. Solubility and electrophoretic behavior of some proteins of *post mortem* aged bovine muscle. *J. Food Sci.*, **31** (2), 151-156.

BUTCHER L., 1971. *Eating quality in Danish cattle as related to sex and age.* 17th Europ. Meet. of Meat Res. Workers. Bristol.

DAVEY C. L., GILBERT K. V., 1966. Studies in meat tenderness. II. Proteolysis and aging of beef. *J. Food Sci.*, **31** (2), 135-140.

DUMONT B. L., 1971. *Meat toughness index of beef carcasses.* 17th Europ. Meet. of Meat Res. Workers. Bristol.

DUMONT B. L., 1974. Étude de la tendreté de la viande. III. Variation de la dureté des viandes de taurillon en fonction de leur durée de conservation. *Ann. Zootech.*, **23**, 227-230.

FIELD R. A., 1971. Effect of castration on meat quality and quantity. *J. anim. Sci.*, **32** (5), 849-858.

FOLCH J., LEES M., SLOANE-STANLEY G. H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, (226), 497-499.

FUJIMAKI M., ARAKAWA N., OKITANI A., 1965. The changes of myosin B during storage of rabbit muscle. *J. Food Sci.*, **30** (6), 937-943.

GOLL D. E., HENDERSON D. W., KLINE E. A., 1964. *Post mortem* changes in physical and chemical properties of bovine muscle. *J. Food Sci.*, **29** (5), 590-596.

GOUTEFONGEA R., 1966. Étude comparative de différentes méthodes de mesure du pouvoir de rétention d'eau de la viande de porc. *Ann. Zootech.*, **15**, 291-295.

HAMM R., 1960. Biochemistry of meat hydration. *Adv. Food Res.*, 355-443.

HEGARTY G. R., BRATZLER L. J., PEARSON A. M., 1963. The relationship of some intracellular protein characteristics to beef muscle tenderness. *J. Food Sci.*, **28**, 525-532.

HOOD R. L., ALLEN E., 1971. Influence of sex and *post mortem* aging in intramuscular and subcutaneous bovine lipids. *J. Food Sci.*, **36** (5), 786-790.

KHAN A. W., VAN DER BERG L., 1964. Some protein changes during *post mortem* tenderization in poultry meat. *J. Food Sci.*, **29** (5), 597-601.

KOPP J., VALIN C., 1971. *Contribution à l'étude de l'action de la cathepsine D sur certaines structures musculaires : myofibrilles et collagène.* 17th Europ. Meet. of Meat Res. Workers. Bristol.

MACDOUGALL D. R., RHODES D. N., 1971. Characteristics of the appearance of meat. III. Studies in the colour of meat from young bulls. *J. Sci. Food Agric.*, **23**, 637-647.

MOORE S., STEIN W. B., 1954. A modified ninhydrin reagent for the photometric determination of amino acids and related compounds. *J. Biol. Chem.*, (211), 907-913.

REAGAN J. O., CARPENTER Z. L., SMITH G. C., KING G. T., 1971. Comparison of palatability traits of beef produced by young bulls and steers. *J. anim. Sci.*, **32** (4), 641-646.

SALE P., 1971. *Évolution de quelques propriétés mécaniques du muscle pendant la maturation.* 17th Europ. Meet. of Meat Res. Workers Bristol.

SALE P., VALIN C., 1970. *Problèmes posés par la détermination des modifications de la structure du muscle au cours de la maturation.* 16th Europ. Meet. of Meat Res. Workers. Varna.

TARLADGIS B. G., PEARSON A. M., DUGAN L. R., 1964. Chemistry of the 2-thiobarbituric acid test for determination of oxidative rancidity in foods. *J. Sci. Food Agric.*, **15**, 602-607.

VALIN C., CHARPENTIER J., 1969. Catabolisme *post mortem* des nucléotides acidosolubles libres et liés du muscle de bovin. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, **9** (4), 555-562.

VALIN C., 1970. Activation des enzymes lysosomales du muscle au cours de la maturation de la viande. *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, **10**, 313-316.

*Ann. Technol. agric.*, 1975, **24** (1), 65-74.

# EXTRACTION ET CONCENTRATION DES CONSTITUANTS VOLATILS DES GRAINS DE CÉRÉALES EN VUE DE LEUR ANALYSE PAR CHROMATOGRAPHIE EN PHASE GAZEUSE

D. RICHARD-MOLARD et R. DRAPRON

*Station de Biochimie et Physico-chimie des Céréales,*
*E. N. S. I. A. A. (au C. E. R. D. I. A.), I. N. R. A.,*
*91300 Massy*

## RÉSUMÉ

L'analyse par chromatographie en phase gazeuse des composés volatils des céréales est envisagée pour évaluer l'état de conservation des grains stockés.

Compte tenu de la faiblesse de l'émission volatile normale des grains, il est indispensable de concentrer fortement les produits recherchés avant de les soumettre à l'analyse.

Des essais préliminaires, conduits suivant différents procédés décrits par ailleurs et appliqués ici au cas des grains stockés, n'ont pas donné de résultats satisfaisants. Il s'est donc avéré nécessaire de mettre au point une méthode rapide, facile à mettre en œuvre et permettant d'atteindre des concentrations suffisantes.

La technique proposée consiste en une désorption sous vide partiel des produits volatils qui sont ensuite extraits du condensat obtenu au moyen de chlorure de méthylène, la phase organique qui en résulte étant concentrée par évaporation du solvant.

Mots clés : *céréales, conservation, constituants volatils.*

## I. — INTRODUCTION

L'analyse sensorielle est utilisée de façon constante pour apprécier la valeur commerciale des céréales, du blé tout spécialement. Cette appréciation, éminemment subjective, ne permet pas de relier une odeur anormale décelée dans un lot à la cause qui l'a produite, fermentation intracellulaire, développement de micro-organismes, introduction accidentelle de substances diverses par exemple.

Le développement des micro-organismes, en particulier des moisissures, qui constitue l'une des causes majeures de la détérioration des grains après la récolte (MULTON, POISSON, GUILBOT, 1969) est difficile à suivre par les méthodes classiques d'analyses microbiologiques, celles-ci ne pouvant fournir des résultats complets que plusieurs jours après le prélèvement d'un échantillon suspect, alors que le stock de grains risque de se détériorer d'une façon irrémédiable pendant ce temps. Il serait donc d'un intérêt évident, pour l'organisme stockeur, de pouvoir disposer d'un moyen permettant une détection non différée d'un développement microbien, pour intervenir à temps et éviter une prolifération des micro-organismes au niveau des grains.

L'activité des micro-organismes se manifeste, entre autres, par la formation de nombreux composés volatils, comme en témoigne l'apparition d'odeurs anormales dans les grains altérés (KRETOVITCH, PROKHOROVA, 1960). Aussi la chromatographie en phase gazeuse des produits volatils des grains devrait-elle permettre de se rendre compte, de manière objective, de l'état de conservation d'un lot et même de détecter, dès son tout début, un développement de la microflore associée.

Au cours de stockages expérimentaux de grains de maïs et de blé, nous avons tenté l'analyse, par chromatographie en phase gazeuse, de l'atmosphère intergranulaire, soit par la technique de prélèvement direct proposée par HOUGEN, QUILLIAN et CURRAN (1971), pour l'étude des produits volatils des grains, soit après une concentration préalable au moyen d'une précolonne garnie d'un adsorbant sélectif selon la méthode utilisée par SCHULTZ, FLATH et MON (1971), lors d'une étude des constituants volatils de l'orange. Nous avons également employé l'entraînement par un gaz inerte suivi d'une condensation à basse température des constituants volatils entraînés.

Les résultats que nous avons pu obtenir se sont révélés difficilement exploitables, les concentrations en produits volatils que donnent ces techniques étant trop faibles pour qu'il soit possible de mettre en évidence un développement de la microflore dès son début et d'envisager l'identification des composés isolés. En outre, comme le souligne CHANG (1973), les constituants les moins volatils ou les plus polaires sont difficilement mis en évidence par ces techniques.

Pour pallier cette difficulté, l'extraction par entraînement à la vapeur d'eau a été tentée mais n'a pas été retenue en raison du risque d'artefact du fait de la température élevée à laquelle est porté l'échantillon (WEURMAN, GROENEN et VAN GEMERT, 1970).

Pour étudier les composés volatils d'origine microbienne qui se forment dans les céréales, KAMINSKY *et al.* (1972) ont mis au point une méthode permettant d'extraire et de concentrer de manière satisfaisante les substances volatiles.

Les grains sont broyés et placés dans un milieu aqueux. Le mélange est alors soumis à une distillation pendant plusieurs heures sous pression réduite, en atmosphère d'azote et à température moyenne, comprise entre 15 et 30°C. Les produits recherchés sont extraits du distillat au moyen de chlorure de méthylène ; la solution obtenue est ensuite concentrée par distillation du solvant à pression normale. Cette méthode donne de bons résultats mais se révèle peu pratique en raison de sa durée, le temps nécessaire à l'obtention d'un extrait concentré étant de deux jours au moins.

Ainsi, aucune des méthodes proposées n'étant réellement satisfaisante, nous avons été amenés à rechercher et à mettre au point une technique rapide conduisant à l'obtention des composés volatils, en solution suffisamment concentrée et en quantité suffisante pour en faciliter l'analyse.

## II. — MÉTHODE PROPOSÉE

### *Principe*

La méthode proposée fait intervenir une désorption des produits volatils sous vide partiel, suivie de leur condensation à basse température. Les composés volatils ainsi désorbés sont extraits de la phase aqueuse condensée au moyen de chlorure de méthylène ; la solution obtenue est alors concentrée par évaporation partielle du solvant, sous courant d'azote.

### *Domaine d'application*

La méthode est applicable aux grains de céréales et à leurs dérivés, et éventuellement à d'autres produits alimentaires peu hydratés.

### *Description*

1. *Réactifs.*

— Chlorure de méthylène, azote R, éthanol, glace carbonique, chlorure de sodium pur. Le chlorure de méthylène utilisé (origine Baker) est purifié par lavages successifs à l'acide sulfurique concentré, au carbonate de sodium (100 g/l) et à l'eau distillée. Le produit est séché sur chlorure de calcium, puis est porté à ébullition, sous reflux, pendant 30 mn en présence d'anhydride phosphorique. Le solvant est alors bidistillé (P. E. = 40°C), puis conservé à 5°C à l'abri de la lumière.

2. *Matériel.*

— Broyeur, type Waring-Blendor,
— Appareillage de désorption (fig. 1),

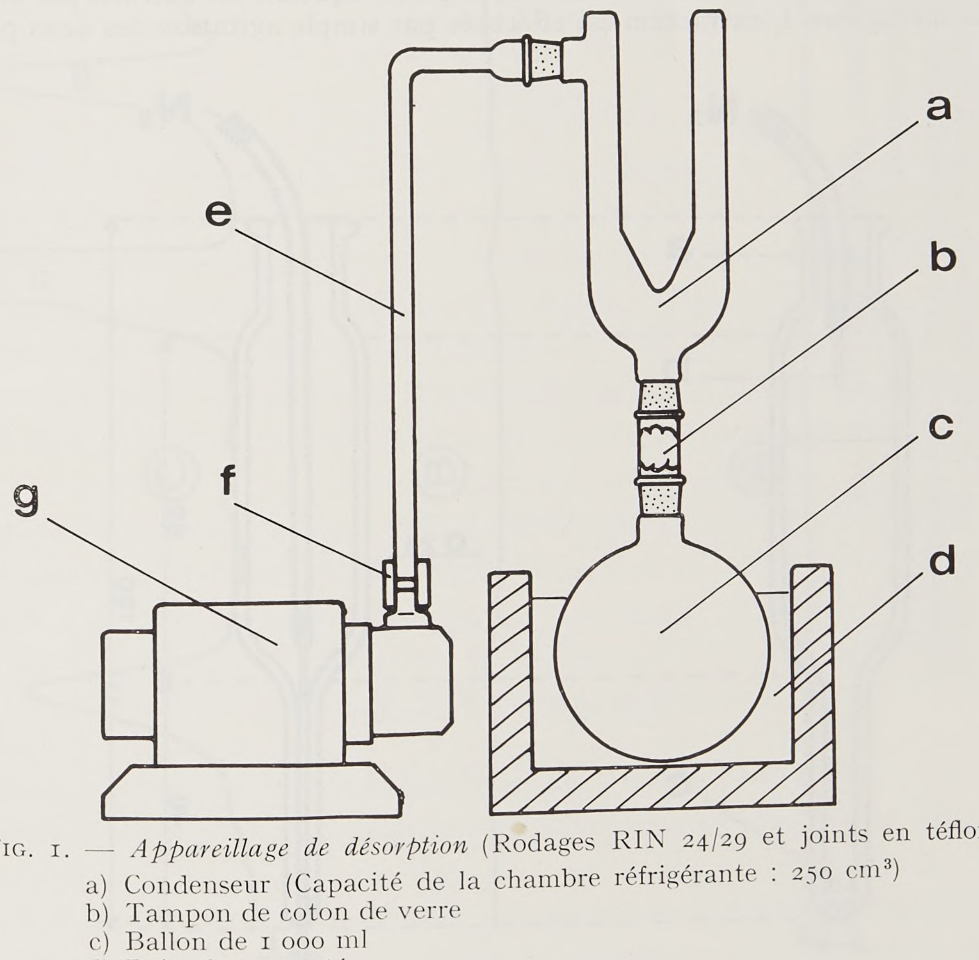



FIG. 1. — *Appareillage de désorption* (Rodages RIN 24/29 et joints en téflon)
a) Condenseur (Capacité de la chambre réfrigérante : 250 cm³)
b) Tampon de coton de verre
c) Ballon de 1 000 ml
d) Bain thermostaté
e) Tube de liaison en verre
f) Raccord en téflon
g) Pompe à palettes

— Fiole d'erlenmeyer rodée de 100 ml,
— Agitateur magnétique avec barreau revêtu de téflon,
— Ampoule à décanter de 60 ml,
— Dispositif pour concentrer la phase organique (fig. 2),
— Ampoules de verre pour conserver les extraits,
— Chromatographe en phase gazeuse.

3. *Préparation de l'échantillon.*

L'échantillon de grain est préalablement refroidi au congélateur. Lorsque sa température atteint 0°C, on effectue un broyage grossier à l'aide d'un broyeur Waring-Blendor, tournant à 25 000 tr/mn durant 60 secondes.

4. *Mode opératoire.*

4. 1. *Désorption.*

L'échantillon broyé, représentant 100 g de matière sèche, est introduit dans le ballon de l'appareil à désorption, placé dans le bain thermostaté à 60°C. L'échantillon est alors réchauffé durant 15 mn. La désorption des constituants volatils s'effectue ensuite pendant 90 mn, sous vide partiel (1-10 torr.) obtenu à l'aide d'une pompe à palettes fonctionnant en continu. L'eau et la majorité des substances volatiles se condensent dans la partie inférieure du piège, refroidi à — 78°C par un mélange de glace carbonique et d'éthanol.

4. 2. *Récupération du condensat.*

La phase condensée sous forme de glace à la partie inférieure du condenseur est décongelée rapidement sous pression normale, les parois extérieures du condenseur étant réchauffées par contact avec de l'eau chaude (40°C environ). Le liquide est alors recueilli dans une fiole d'erlenmeyer rodée de 100 ml puis pesé, pour détermination du volume obtenu.

4. 3. *Extraction des composés volatils.*

Après saturation par du chlorure de sodium, la phase aqueuse est extraite par un volume égal de chlorure de méthylène. L'extraction est effectuée par simple agitation des deux phases à l'aide

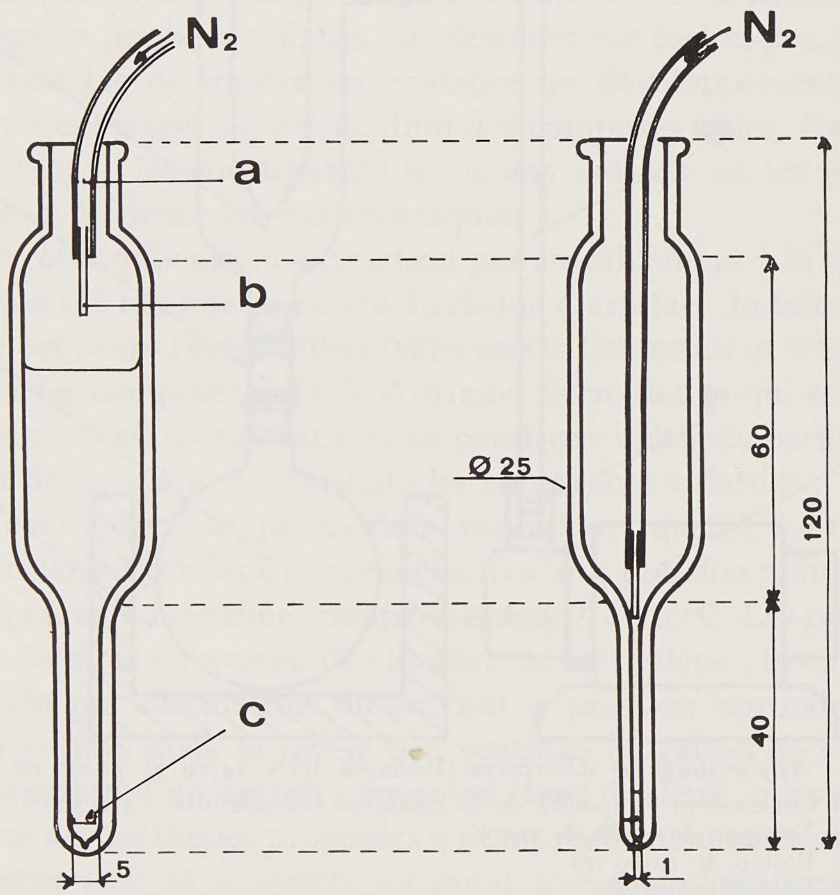



FIG. 2. — *Dispositif pour l'évaporation du solvant* (cotes en mm)
a) Tube d'arrivée d'azote en téflon b) Embout en verre
c) Trait repère à 50 microlitres

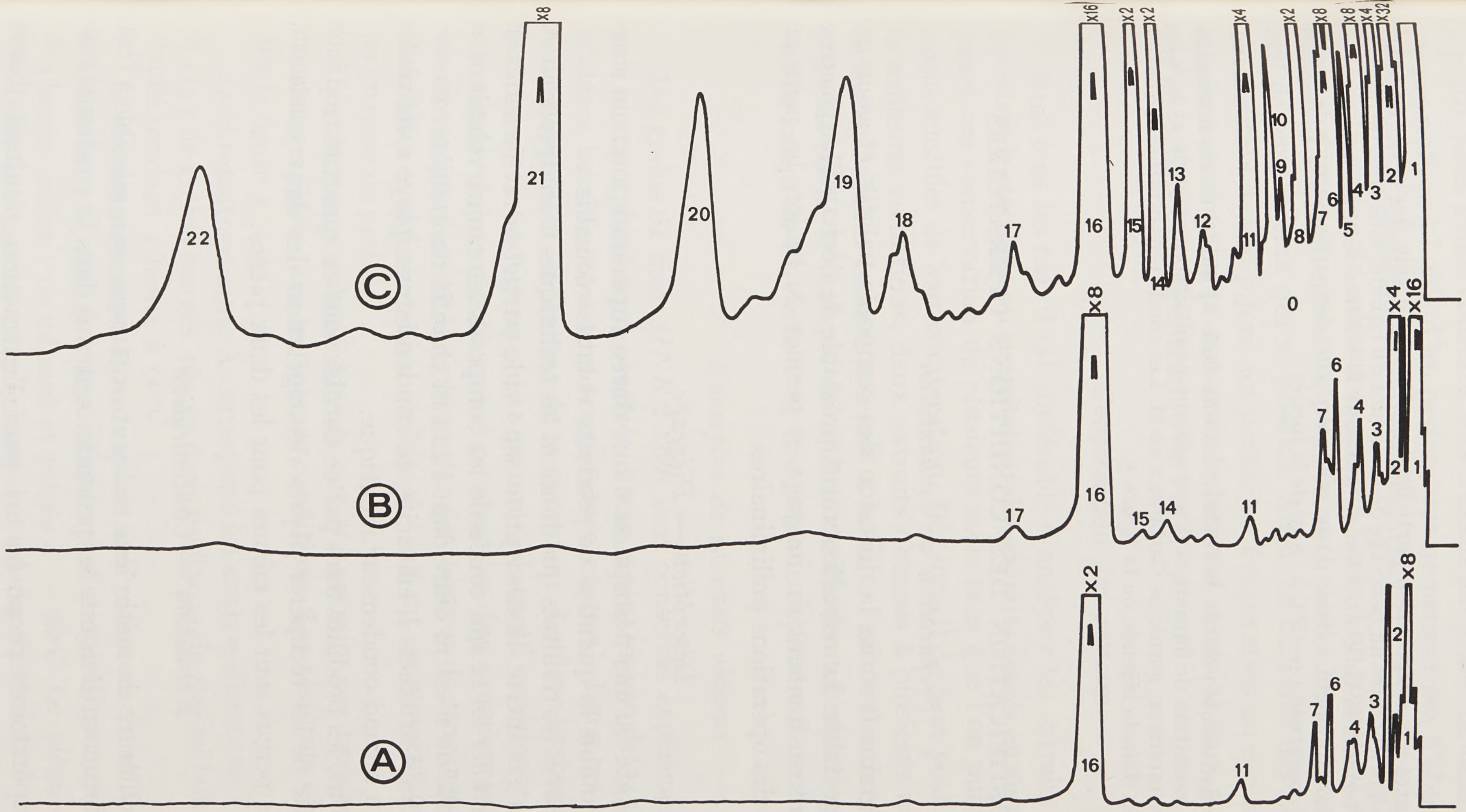



Fig. 3. — *Composés volatils extraits de maïs après 12 jours de stockage*

A. Analyse directe ; B. Entraînement à l'azote ; C. Désorption sous vide

Appareil Girdel type 75 FD 1. Chromatographie isotherme à 80°C sur colonne capillaire de 25 m, ∅ int. 0,5 mm, en acier, Carbowax 20 M. Pression d'entrée 0,2 bar, réglage du diviseur sur 5 p. 100. Atténuation : × 1 sauf indication. Détection par ionisation de flamme

*Nature des principaux constituants*

(1) Pic composite
(2) Hexanal
(3) Vinyl cétone, non identifiée
(4) Méthyl-3 butanol-1
(5) non identifié
(6) Pentanol-1
(7) Octanone-3
(8) Acètoïne
(9-10) non identifiés
(11) Hexanol-1
(12) Octanol-3
(13-14-15) non identifiés
(16) Octène 1-ol-3
(17-18) Sesquiterpènes, non identifiés
(19) Éthylanisole
(20) Pyrazine, non identifiée
(21) non identifié
(22) Sesquiterpène, non identifié

d'un agitateur magnétique en utilisant un barreau revêtu de téflon. La vitesse de rotation est réglée de telle sorte qu'il se forme une émulsion entre les deux phases. Après 30 mn, le mélange est transvasé dans une ampoule à décanter. La phase organique, qui se sépare, est recueillie dans le tube jaugé, représenté sur la figure 2.

4. 4. *Concentration.*

L'extrait est concentré par évaporation partielle du solvant à l'aide d'un courant d'azote. Le débit est réglé de manière à assurer un balayage de la surface du liquide, sans créer de turbulence excessive (fig. 2 *a*). On termine la concentration en ajustant le volume résiduel à 50 microlitres (fig. 2 *b*). L'extrait est alors transféré, à l'aide d'une microseringue, dans une ampoule de verre qui est scellée à la flamme et conservée à —18°C à l'abri de la lumière.

4. 5. *Chromatographie.*

La séparation des constituants volatils de l'extrait est effectuée à l'aide d'un chromatographe équipé d'un détecteur à ionisation de flamme et d'une colonne capillaire en acier de 25 m de long et de 0,5 mm de diamètre intérieur, garnie de Carbowax 20 M. Les conditions d'utilisation du chromatographe sont données dans la légende de la figure 3.

## III. — JUSTIFICATION DES CONDITIONS OPÉRATOIRES

### *Préparation de l'échantillon*

Le broyage des grains favorise la diffusion des composés volatils et assure une récupération plus importante. Le refroidissement préalable de l'échantillon compense l'échauffement produit au moment du broyage et permet de limiter les pertes par évaporation au cours des opérations préliminaires.

### *Désorption — Piégeage*

Nous avons constaté qu'une désorption d'une durée supérieure à 90 mn n'augmente pas de façon notable la quantité de produits volatils recueillis.

Par comparaison avec les résultats que donnent les techniques d'analyse directe ou l'entraînement par un gaz inerte, la désorption sous vide partiel se révèle nettement plus efficace, en particulier en ce qui concerne les composés les moins volatils ou les plus polaires. L'échantillon n'est ni dilué dans l'eau ni chauffé de manière excessive, ce qui limite les risques d'artefact. L'efficacité du condenseur employé a été vérifiée en plaçant en série un second condenseur identique.

Dans ces conditions, les produits fixés par ce dernier sont en quantité trop faible pour qu'il soit possible de les récupérer. Après décongélation des deux condensats, les caractères olfactifs perçus sont les mêmes pour les deux pièges.

### *Extraction — Concentration*

L'utilisation du chlorure de méthylène, solvant organique non miscible à l'eau, permet d'extraire de façon satisfaisante les produits contenus dans le condensat récupéré.

Les conditions opératoires proposées ici pour l'extraction résultent d'essais effectués avec des solutions aqueuses modèles de faible concentration en quelques composés volatils. Bien qu'elles ne représentent pas les conditions optimales, elles constituent le meilleur compromis entre l'efficacité et la durée de cette opération.

Ainsi, pour des solutions aqueuses d'alcool isoamylique ou d'hexanal à 200 p.p.m., on obtient des taux de récupération de l'ordre de 80 p. 100. Pour ces deux composés, la saturation de la phase aqueuse par le chlorure de sodium améliore ce taux d'environ 10 p. 100. Nous avons constaté, lors d'essais sur grains de maïs, qu'une extraction de 4 heures réalisée à l'aide d'un perforateur ne permet pas d'obtenir une concentration sensiblement meilleure des composés volatils dans la phase organique.

L'évaporation du solvant en excès à l'aide d'un courant d'azote permet d'obtenir rapidement une concentration poussée, sans pertes importantes, du fait de l'abaissement de température qui se produit. Ainsi, en utilisant des solutions modèles à la concentration de 200 p.p.m. les pertes par évaporation au cours de l'opération ont été estimées à environ 10 p. 100 pour le butanol et moins de 5 p. 100 pour l'octanol-*n*, pour un facteur de concentration de l'ordre de 500.

### *Conservation des extraits*

Dans tous les cas, il est préférable d'analyser les extraits aussitôt que possible. Cependant le stockage au congélateur des extraits placés en ampoules de verre scellées permet une conservation de plusieurs mois sans que l'on puisse déceler des modifications sensibles de leur composition. Dès lors, il devient possible de comparer, dans les meilleures conditions, deux extraits obtenus à plusieurs mois d'intervalle en les chromatographiant immédiatement à la suite l'un de l'autre. Ceci permet de pallier en grande partie le manque de fidélité du chromatographe, ce défaut étant surtout sensible lorsqu'on travaille avec une colonne capillaire de grande efficacité.

### *Exemples de résultats obtenus*

Des grains de maïs (*INRA 260*) sont conservés expérimentalement pendant 12 jours en atmosphère semi-confinée, à une teneur en eau de 33 p. 100, par rapport à la substance humide, et à une température de 22°C. Dans ces conditions, on observe un développement important de la microflore. La flore bactérienne se maintient à un haut niveau ($10^8$-$10^9$ germes par gramme) durant l'expérience. Les moisissures champêtres se développent activement pendant les cinq premiers jours puis sont progressivement remplacées sur les grains par des espèces de stockage appartenant au genre *Penicillium* et qui sont bien visibles à l'œil nu au moment de l'analyse ($10^7$ spores par gramme de grain).

Les composés volatils formés ont été extraits par trois méthodes différentes et chromatographiés dans les mêmes conditions. Les résultats obtenus sont représentés dans la figure 3.

Le chromatogramme A correspond à l'analyse directe de l'atmosphère au contact de 133 g de grains broyés, placés dans un flacon de 500 ml bouché hermétiquement et chauffé pendant 1 heure à 90°C.

Le chromatogramme B correspond aux composés volatils isolés à partir de 133 g de grains broyés, portés à une température de 30°C, par un entraînement à l'azote de 4 heures (débit : 10 ml/mn) et piégés à — 78°C. Le piège contenant les produits ainsi isolés est bouché hermétiquement en fin d'extraction et réchauffé à 30°C. Le prélèvement s'effectue, à travers le bouchon, à l'aide d'une seringue à gaz.

Le chromatogramme C correspond aux composés volatils obtenus par la méthode que nous venons de décrire.

Les quantités injectées sont de 2 ml de vapeur pour les deux premiers cas et de 2 microlitres de l'extrait dans le troisième cas.

L'examen des profils chromatographiques de la figure 3 permet de comparer l'efficacité des différentes méthodes employées et de constater combien la technique utilisée conditionne les résultats obtenus.

Si les profils A et B sont assez semblables, faisant cependant apparaître une meilleure concentration dans le cas de l'entraînement par l'azote (profil B), le profil C se distingue nettement des précédents à la fois par le nombre des constituants mis en évidence et par la concentration de chacun d'eux. Ces différences sont particulièrement nettes en ce qui concerne les composés élués après le pic n° 16, qui ne sont pratiquement pas décelés par les deux premières méthodes.

L'identité de certains de ces constituants a pu être établie à partir du mélange C, par spectrométrie de masse (fig. 3), et nous avons extrapolé ces données aux profils A et B en tenant compte des volumes de rétention et des caractères olfactifs des constituants.

## CONCLUSIONS

La méthode d'extraction et de concentration décrite permet d'obtenir, à partir de substrats à émission volatile faible, des extraits suffisamment concentrés pour en permettre l'analyse par chromatographie en phase gazeuse, tout en présentant une bonne répétabilité.

Par sa simplicité et sa relative rapidité, cette méthode d'isolement des constituants volatils des grains se prête bien à des analyses en petites séries, le temps nécessaire à l'obtention d'un extrait n'excèdant pas 5 heures.

Les valeurs préconisées ici en ce qui concerne la masse d'échantillon de grain analysée et la durée de la désorption ont été fixées de manière à obtenir une concentration finale suffisante, dans le minimum de temps. Nous avons vérifié qu'en augmentant la masse de l'échantillon on augmente d'autant la concentration finale obtenue, tout en rallongeant sensiblement la durée des opérations.

Un développement important de la microflore du maïs se traduit par la formation d'un nombre important de produits volatils très variés dans leur nature.

Ces résultats permettent d'envisager la détection du tout début de l'activité des micro-organismes. La sensibilité de cette détection dépendant étroitement de la concentration en constituants volatils qu'il est possible d'obtenir, l'intérêt de la méthode proposée apparaît clairement.

Des expériences sont actuellement entreprises pour préciser les relations existant entre la production de ces composés volatils et le développement de la microflore. En outre, des recherches sont envisagées afin d'établir dans quelle mesure les produits formés sont spécifiques d'un micro-organisme donné.

*Reçu pour publication en février 1975.*

## REMERCIEMENTS

Nous tenons à remercier P. Dubois, de la Station de Technologie des Produits végétaux de l'I. N. R. A., Dijon, pour les déterminations par spectrométrie de masse qu'il a effectuées.

## SUMMARY

### EXTRACTION AND CONCENTRATION OF THE VOLATILE CONSTITUENTS OF CEREAL GRAINS WITH A VIEW TO THEIR ANALYSIS BY GAS CHROMATOGRAPHY

Analysis, by gas chromatography, of the volatile compounds of cereals, is envisaged in order to estimate the state of conservation of stored grains.

Taking into account the smallness of the grains' normal volatile emission, it is essential to highly concentrate the substances studied before subjecting them to analysis.

Preliminary tests, conducted following various methods described in another connection and applied here in the case of stored grains, did not give satisfactory results. It therefore proved necessary to develop a quick, easy to use method, enabling adequate concentrations to be achieved.

The technique proposed consists of partial vacuum desorption of the volatile substances, which are then extracted from the condensate obtained by means of methylene chloride, the resulting organic phase being concentrated by evaporation of the solvent.



## RESUMEN

### EXTRACCION Y CONCENTRACION DE LOS COMPONENTES VOLATILES DE LAS SEMILLAS DE CEREALES CON MIRAS A SU ANALISIS POR CROMATOGRAFIA EN FASE GASEOSA

El análisis por cromatografía en fase gaseosa de los compuestos volátiles de los cereales es considerada en este estudio por objeto de evaluar el estado de conservación de las semillas almacenadas.

Cuenta habida de la poca cuantía de la emisión volátil normal de las semillas, es indispensable concentrar fuertemente los productos investigados antes de someterlos al análisis.

Los ensayos preliminares, efectuados según los procedimientos descritos por separado y aplicados aquí al caso de las semillas almacenadas, no han llegado a dar los resultados satisfactorios que se esperaba. Ha sido preciso, consecutivamente, poner a punto un método rápido, de fácil aplicación y que permite alcanzar concentraciones suficientes.

Una técnica propuesta consiste en una desorción en vacío parcial de los productos volátiles, que, acto seguido, son extraidos del condensado obtenido por medio de cloruro de metileno, quedando concentrada la fase orgánica que viene a derivarse por evaporación del disolvente.



## RIASSUNTO

### ESTRAZIONE E CONCENTRAZIONE DEI COSTITUENTI VOLATILI DEI CHICCHI DI CEREALI ALLO SCOPO DI ANALIZZARLI MEDIANTE GAS-CROMATOGRAFIA

L'analisi mediante gas-cromatografia dei composti volatili dei cereali è prevista per valutare lo stato di conservazione dei grani immagazzinati.

Conto tenuto della debolezza dell'emissione volatile normale dei chicchi, è indispensabile concentrare fortemente i prodotti ricercati prima di sottoporli all'analisi.

Delle prove preliminari, effettuate secondo diversi procedimenti descritti in altra sede e applicati qui ai chicchi immagazzinati non hanno dato dei risultati soddisfacenti. E'stato dunque necessario mettere a punto un metodo rapido, facile da applicare e che possa permettere di raggiungere delle concentrazioni sufficienti.

La tecnica proposta consiste in un désorbimento sotto vuoto parziale di prodotti volatili che sono poi estratti dal condensato ottenuto tramite del chloruro di metilene ; la fase organica che ne risulta è concentrata mediante vaporazione del solvente.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES


CHANG S. S., 1973. Flavor component identification. *Food Technol.*, **27** (4), 27-40.

HOUGEN F. W., QUILLIAN M. A., CURRAN W. A., 1971. Head space vapors from cereal grains. *J. agric. Food. Chem.*, **19** (1), 182-183.

KAMINSKI E., LIBBEY L. M., STAWICKI S., WASOWICZ E., 1972. Identification of the predominant volatile compounds produced by *Aspergillus flavus*. *Appl. Microbiol.*, **24** (5), 721-726.

KRETOVITCH V. L., PROKHOROVA A. P., 1960. Caractéristiques biochimiques de graines ayant différentes odeurs. *Nouvelles de l'Académie des Sc. de l'U. R. S. S.*, Ser. B, 446-450.

MULTON J. L., POISSON J., GUILBOT A., 1969. Les altérations du grain de blé après la récolte. *Bull. techn. Inf.*, (244), 853-870.

SCHULTZ T. H., FLATH R. A., MON T. R., 1971. Analysis of orange volatile with vapor sampling. *J. agric. Food Chem.* **19** (5), 1060-1065.

WEURMAN C., GROENEN P. J., VAN GEMERT J., 1970. Experiments on « high-vacuum transfer » in food odor research. *Die Nahrung*, **14** (7), 607-616.

*Ann. Technol. agric.*, 1975, **24** (1), 75-82.

# ACTION DES CHAMPS MAGNÉTIQUES ET ÉLECTRIQUES SUR LA CROISSANCE ET LE TAUX DES MUTATIONS DE DIVERS MICRO-ORGANISMES

J. RIVIÈRE, C. GARY*, J.-C. VERGNAUD* et J. CABANES**
avec la collaboration technique de Mme OLIME

*Institut national agronomique,*
*Paris-Grignon, Centre de Paris,*
* *Direction des Études et Recherches d'E. D. F.*
** *Comité médical d'E. D. F.-G. D. F.*

---

## RÉSUMÉ

L'expérimentation réalisée a eu pour but de mettre en évidence une action éventuelle des champs électriques et magnétiques engendrés à leur voisinage par les lignes aériennes à très haute tension sur divers micro-organismes.

Bien que le nombre assez réduit des résultats obtenus n'ait pas permis de faire une étude statistique, on n'a pas observé de modifications du taux de mutation et du taux de croissance de la souche bactérienne (*Escherichia coli* HfrH), même en utilisant des champs très intenses qui ont atteint 200 kV/m et 140 gauss. La croissance de la souche fongique (*Penicillium chrysogenum*) n'a pas été modifiée. Bien entendu, les cultures témoins ont été faites en même temps et dans les mêmes conditions, ce qui a posé des problèmes expérimentaux difficiles à résoudre.

Mots clés : *champ magnétique, champ électrique, micro-organismes.*

---

## I. — INTRODUCTION

L'expérimentation réalisée a pour but de mettre en évidence une action éventuelle des champs électriques et magnétiques engendrés à leur voisinage par les lignes aériennes à très haute tension sur des micro-organismes.

Il y a peu de publications ayant trait aux champs électriques appliqués à des micro-organismes en croissance, car des conditions expérimentales convenables sont difficiles à réaliser. KONIG et KREMPL-LAMPRECHT ont signalé, dès 1959, que des

champs électriques de basse fréquence, réalisés à l'aide de plaques métalliques distantes de 7,5 cm auxquelles ils appliquent une tension sinusoïdale, sont responsables d'une augmentation du taux de croissance d'une bactérie (*Lactobacillus casei*) et d'une levure (*Saccharomyces cerevisiae*). Ces observations ont été confirmées par PAREILLEUX et SICARD (1970) dans le cas d'une souche d'*Escherichia coli*, tandis que BOWLEY (1972) observe une diminution du taux de croissance avec une autre souche de la même espèce. Il faut noter que les conditions expérimentales réalisées au cours de ces deux dernières recherches ne permettent pas d'interpréter ces résultats contradictoires. En effet les champs électriques étant obtenus grâce à des électrodes plongées dans le milieu, diverses substances sont formées au voisinage des électrodes, au cours d'une électrolyse.

L'action exercée par les champs magnétiques est également variable suivant les cas.

On peut observer une diminution du taux de croissance. C'est le cas d'une bactérie (*Staphylococcus aureus*) dont on mesure la croissance par densité optique (HEDRICK, 1964) ou d'une levure (*Saccharomyces cerevisiae*) dont on compte les cellules dans un hématimètre (VAN NOSTRAN *et al.*, 1967), les cultures éprouvées ayant été soumises à un champ magnétique constant de 4 600 gauss.

Par ailleurs, l'exposition d'une culture d'*Escherichia coli* $K_{12}$ dans un champ magnétique constant de 5 000 gauss ne modifie pas le taux de croissance, tandis qu'une exposition de deux heures à 32 000 gauss provoque une diminution temporaire du nombre des cellules viables, c'est-à-dire capables de donner naissance à des colonies dans un milieu gélosé (SCHEMELKONOVA *et al.*, 1970). Cependant des champs magnétiques constants dont l'intensité est comprise entre 5 000 et 8 000 gauss provoquent un phénomène curieux. C'est ainsi que l'on peut noter, dans le cas de levures (*Saccharomyces cerevisiae*) en anaérobiose, qu'il y a d'abord un ralentissement de la croissance. Puis cette dernière s'accélère quelques heures après le début de l'exposition au champ magnétique, et dépasse celle du témoin. Avec une bactérie (*Micrococcus denitrificans*), la phase de ralentissement n'existe pas, il y a une augmentation significative du taux de croissance (5,8 à 13,3 p. 100) trois heures après le début de l'exposition. Au cours de cette expérience, la croissance de ces deux souches a été mesurée à l'aide de méthodes manométriques (THIEMANN et WAGNER, 1970).

## 2. — MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 2. 1. — *Matériel biologique*

On utilise une souche bactérienne (*Escherichia coli* HfrH) et une souche fongique (*Penicillium chrysogenum*).

### 2. 2. — *Réalisation des champs électriques*

Les champs électriques alternatifs à 50 Hz sont obtenus à l'aide de deux plaques métalliques planes, circulaires, d'environ 15 cm de diamètre, placées vis-à-vis et parallèlement l'une à l'autre. Leurs bords sont soigneusement arrondis pour éviter l'ionisation par effet couronne. La disposition des plaques, les tensions appliquées et les champs obtenus sont décrit dans le tableau 1.

TABLEAU I

*Caractéristiques des champs électriques utilisés*

| Valeur du champ en kV/mètre | Tension appliquée entre les plaques en volts efficaces | Distance des plaques en cm |
|---|---|---|
| 10 | 900 | 9 |
| 50 | 1 800 | 3,6 |
| 200 | 5 000 | 2,5 |

### 2. 3. — *Réalisation des champs magnétiques alternatifs à 50 Hz*

Il y a plusieurs dispositifs. Pour étudier leur action sur le taux des mutations d'une souche d'*Escherichia coli* et sur la croissance d'une souche de *Penicillium chrysogenum*, on a réalisé une boucle de bobinage formée de 45 spires circulaires suivant un tore de 14 cm de diamètre. Le champ obtenu dans le plan de la boucle par un courant de 1 ampère est de 4 gauss ($400 \times 10^{-6}$ tesla, soit dix fois le champ terreste). Sur l'axe de la boucle et dans un plan parallèle situé à 13,4 cm de celle-ci, on obtient un champ de 0,4 gauss ($40 \times 10^{-6}$ tesla, soit le champ terrestre).

Dans le but d'étudier l'action d'un champ magnétique sur la croissance de la souche d'*Escherichia coli* en milieu liquide, on le réalise à l'aide d'un solénoïde constitué d'un enroulement à spire jointive de 11,4 spires par cm sur un cylindre de 12,6 cm de hauteur et 8 cm de diamètre. Quand ces spires sont parcourues par un courant de 0,350 ampères, le champ magnétique obtenu dans le milieu liquide atteint 4 gauss (soit $40 \times 10 \times 10^{-6}$ tesla). Une fiole erlenmeyer de 150 ml contenant 50 ml de milieu liquide, plus un barreau magnétique enrobé de téflon, placée sur un agitateur (Prolabo), peut ainsi, après ensemencement, être soumise à l'action du champ lorsqu'elle se trouve à l'intérieur du cylindre.

Pour obtenir un témoin comparatif, on supprime le passage du courant dans le solénoïde. En effet, la dissipation d'énergie par effet Joule dans l'électrolyte soumis à l'induction d'un champ magnétique alternatif de $400 \times 10^{-6}$ tesla est très faible, de l'ordre de $10^{-13}$ watts pour 20 millilitres (VERGNAUD, 1973). Avec un dispositif voisin de plus grandes dimensions, on arrive à avoir un champ de 140 gauss (soit $14\,000 \times 10^{-6}$ tesla).

Tout l'appareillage utilisé se trouve à l'intérieur d'une étuve thermostatée à 30°C ± 1°C.

### 2. 4. — *Milieux de culture*

On utilise un milieu minimum dont la composition est la suivante, pour un litre d'eau distillée :

$KH_2PO_4$ : 13,6 g ; $MgSO_4, 7H_2O$ : 0,02 g ;
$(NH_4)_2SO_4$ : 2 g ; $FeSO_4, 7H_2O$ : 0,005 g ;
thiamine : 0,005 g ; glucose : 4 g ; ce dernier est stérilisé par filtration et ajouté au moment de l'emploi.

Le milieu complet contient, pour un litre d'eau distillée :

peptone pancréatique : 5 g ; NaCl : 5 g ;
extrait de viande : 3 g.

Dans les deux cas, le pH est ajusté à 7,0 avec de la potasse.

Ces deux milieux utilisés pour la souche bactérienne (*Escherichia coli* HfrH) peuvent être gélosés à 15 g par litre (Bacto Agar Difco).

Pour étudier la croissance de *Penicillium chrysogenum*, on emploie une gélose à la pomme de terre glucosée (B. D. Mérieux Réf. 5.1411) qui contient, pour un litre d'eau distillée :

200 ml d'infusion de pomme de terre, glucose 20 g, gélose 15 g.

2. 5. — *Mesure de croissance*

Dans le cas de la souche bactérienne, on calcule le taux de croissance $\mu$ à 30°C lors de la phase exponentielle après avoir mesuré la densité optique à 520 nm (Spectronic 20, Bausch et Lomb). Pour ce faire, on ensemence la fiole avec 1 ml d'une culture en phase stationnaire préalablement diluée dans du milieu minimum pour obtenir $10^3$ cellules par ml. La densité optique est mesurée après 18, 21, 23, 24, 25 et 26 h d'incubation. Le taux de croissance $\mu$ est donné par la formule :

$$\mu = \frac{\log_{10} d_2 - \log_{10} d_1}{(t_2 - t_1) \log_{10} 2}$$

$d_1$ et $d_2$ étant les densités optiques mesurées aux temps $t_1$ et $t_2$.

Pour étudier la croissance de la souche fongique, on dépose avec le fil de platine un peu du prélèvement d'une culture sporulée à la surface d'une plaque de gélose à la pomme de terre glucosée. Ces plaques sont placées en position retournée dans les divers champs, les témoins hors des champs. On ajoute quotidiennement 0,5 ml d'eau stérile dans les couvercles pour maintenir une atmosphère humide. Après 10 à 15 jours d'incubation, on mesure le diamètre des colonies (Antibiotic zone reader, Fischer-Lilly).

2. 6. — *Détermination du taux des mutations*

2. 61. *Méthode directe.*

On emploie la technique des répliques de Lederberg (1952). Pour ce faire, on ensemence 0,1 ml d'une suspension de la souche *Escherichia coli* HfrH à la surface de plaques de milieu gélosé complet de façon à obtenir environ 100 colonies. Ces plaques sont soumises à l'action des divers champs (plus un témoin hors du champ) pendant 48 h d'incubation, puis chaque plaque est répliquée à l'aide d'un tampon de velours stérile sur une plaque de milieu minimum et sur une plaque de milieu complet.

On incube 24 h à 30°C hors de tout champ avant de rechercher la présence de colonies auxotrophes (provenant de cellules mutantes ayant perdu le pouvoir de se développer à la surface du milieu minimum). Lorsqu'on trouve une colonie de ce type, on vérifie bien qu'il s'agit d'une population constituée de cellules mutantes en l'ensemençant dans un tube contenant 10 ml de milieu minimum liquide.

L'expérience se poursuit pendant 30 jours en repartant chaque fois d'une suspension des cellules prélevées sur les plaques soumises à l'action des divers champs (ou de la plaque témoin hors de tout champ).

2. 62. *Méthode à la pénicilline.*

On utilise la technique de Davis (1948) qui est basée sur le fait que la pénicilline n'agit que sur des cellules bactériennes en train de se diviser (prototrophes dans un milieu minimum), permettant ainsi aux rares mutants auxotrophes d'apparaître en proportion plus élevée et d'être facilement détectés.

Ainsi, après avoir mis les plaques ensemencées au contact des champs étudiés, on recueille les cellules constituant les colonies développées à la surface dans 10 ml de milieu complet. Cette suspension est diluée, ensemencée (milieu complet), incubée, centrifugée, lavée, puis remise en suspension dans un milieu minimum glucosé. Après incubation (seules les cellules initiales prototrophes se développent), on ajoute de la pénicilline (40 000 UI/ml). Cette dernière détruit une partie des cellules prototrophes, aboutissant à un enrichissement en mutants auxotrophes que l'on met ensuite en évidence par la technique des répliques.

2. 7. — *Résultats et discussion*

Les résultats sont résumés dans les tableaux 2, 3, et 4.

Les nombres et les pourcentages des mutants auxotrophes obtenus après 30 jours d'expérimentation dans deux champs électriques, deux champs magnétiques et hors de tout champ (témoin) sont indiqués dans le tableau 2. On peut noter que l'on a observé des mutants seulement dans deux cas, lorsque la culture est soumise à un champ magnétique de $40 \times 10^{-6}$ tesla (0,4 gauss) et lorsqu'il s'agit d'un champ électrique de 50 kV/mètre. Cependant, le nombre des colonies

provenant à l'origine d'une cellule mutante est très faible, ne dépassant pas 2 dans le cas le plus élevé.

C'est pourquoi il a paru judicieux d'augmenter la proportion des éventuels mutants auxotrophes par la technique à la pénicilline et d'augmenter également l'intensité de l'agent mutagène possible, c'est-à-dire l'intensité du champ électrique qui pourrait éventuellement être responsable des deux mutations observées.

TABLEAU 2

*Nombre et pourcentage des mutants auxotrophes après 30 jours d'expérimentation* (méthode directe)

| Traitement subi | Nombre total de colonies | Nbre de colonies mutantes observées | Pourcentage des mutants par rapport au nombre total de colonies |
|---|---|---|---|
| Témoin | 853 | 0 | 0 |
| 10 kV/mètre | 802 | 0 | 0 |
| 50 kV/mètre | 889 | 2 | 0,22 |
| 0,4 gauss | 972 | 1 | 0,10 |
| 4 gauss | 939 | 0 | 0 |

Les résultats de cette deuxième expérience sont reproduits dans le tableau 3. Bien que le traitement à la pénicilline enrichisse la proportion des mutants auxotrophes éventuellement présents dans la population initiale prototrophe ayant été soumise aux divers traitements, il n'est pas possible d'obtenir des résultats significatifs, même lorsqu'on augmente l'intensité du champ électrique (qui passe de 50 à 200 kV/mètre). Le taux des mutations de la souche éprouvée (*Escherichia coli* HfrH) ne paraît pas modifié par les champs électriques et magnétiques réalisés au cours de cette expérience.

TABLEAU 3

*Nombre et pourcentage des mutants auxotrophes après 30 jours d'expérimentation* (méthode à la pénicilline)

| Traitement subi | Nombre total des colonies | Nbre de colonies mutantes observées | Pourcentage des mutants par rapport au nombre total |
|---|---|---|---|
| Témoin | 650 | 0 | 0 |
| 10 kV/mètre | 312 | 0 | 0 |
| 50 kV/mètre | 373 | 1 | 0,26 |
| 200 kV/mètre | 729 | 0 | 0 |
| 0,4 gauss | 526 | 0 | 0 |
| 4 gauss | 377 | 0 | 0 |

L'action des champs électriques et magnétiques sur la croissance des micro-organismes éprouvés est résumée dans le tableau 4. On note que la croissance des deux micro-organismes ne paraît pas modifiée dans les conditions de l'expérience. Ce fait n'est pas incompatible avec les résultats cités dans les références bibliographiques qui font intervenir des champs constants ou alternatifs dont les intensités sont très élevées par rapport à celles observées au voisinage des lignes à haute tension. En effet, pour une ligne à haute tension de 765 kV, le champ électrique maximal ne dépasse pas 9 kV/m et le champ magnétique maximal est de $15 \times 10^{-6}$ tesla (0,15 gauss). Dans ces conditions, les intensités obtenues, dans les conditions de l'expérimentation, permettent d'affirmer qu'il n'y a aucune action possible des champs produits au voisinage de ces lignes sur les micro-organismes éprouvés.

TABLEAU 4

*Action des champs électriques et magnétiques sur la croissance d'une bactérie* (E. coli HfrH) *et d'un champignon* (Penicillium chrysogenum)

| Traitement subi | Taux de croissance (*E. coli* HfrH) exprimé en nb. de divisions par heure | Croissance de *P. chrysogenum* (diamètre en cm) après 10 jours | Croissance de *P. chrysogenum* (diamètre en cm) 12 jours |
|---|---|---|---|
| Témoin | 0,88 | 21,7 | 27,0 |
| 10 kV/mètre | On n'a pas pu réaliser un dispositif expérimental convenable permettant de faire des mesures. | 20,5 | 25,0 |
| 50 kV/mètre | | 19,8 | 21,0 |
| 200 kV/mètre | | 22 | 24,3 |
| 0,4 gauss | | 20,5 | 24,5 |
| 4 gauss | 0,87 | 21,9 | 26,5 |
| 140 gauss | 0,77 | On n'a pas pu réaliser un dispositif expérimental convenable permettant de faire des mesures. | |

## 3. — CONCLUSIONS

Des cultures d'une souche bactérienne (*Escherichia coli* HfrH) et d'une souche fongique (*Penicillium chrysogenum*) ont été soumises pendant une longue durée à l'action de champs électriques et magnétiques intenses.

Bien que le nombre assez réduit des résultats obtenus ne permette pas de faire une étude statistique, il n'a pas été observé, par rapport à des cultures témoins faites en même temps et dans les mêmes conditions, de modification du taux de mutation et du taux de croissance de la souche bactérienne, même en utilisant des champs très intenses qui ont atteint 200 kV/m et 140 gauss.

La croissance de la souche de *Penicillium* n'a pas, elle non plus, été modifiée.

*Reçu pour publication en mars 1975.*

## SUMMARY

### ACTION OF MAGNETIC AND ELECTRIC FIELDS ON THE GROWTH AND MUTATION RATE OF VARIOUS MICRO-ORGANISMS

The accomplished experimentation aimed at demonstrating a possible action of electric and magnetic fields generated in their vicinity by very high tension aerial lines on various micro-organisms.

Although it was not possible to make a statistical study due to the rather low number of achieved results, no change was observed either in the mutation rate or in the growth rate of the bacterial strain *Escherichia coli* HfrH, even when very intense fields which reached 200 kV/m and 140 gauss were utilised. The growth of the fungal strain *Penicillium chrysogenum* was not altered. Of course, test cultures were performed in the same time and in the same conditions, which set experimental problems which were hard to solve.

## RESUMEN

### ACCIÓN DE LOS CAMPOS MAGNÉTICOS Y ELÉCTRICOS RESPECTO AL CRECIMIENTO Y AL ÍNDICE DE MUTACIONES DE DIVERSOS MICROORGANISMOS

La experimentación Ilevada a cabo ha tenido por objeto hacer resaltar una posible acción de los campos eléctricos y magnéticos engendrados en sus cercanías por las líneas aéreas de muy alta tensión respecto a diversos microorganismos.

A pesar de que el número bastante reducido de los resultados obtenidos no haya permitido proceder a un estudio estadístico, no se han observado modificaciones en cuanto al coeficiente de mutación y al coeficiente de crecimiento de la estirpe bacteriana (*Eschirichia coli* HfrH), incluso utilizando campos muy intensos que han alcanzado 200 kV/m y 140 gauss. El crecimiento de la estirpe fúngica (*Penicillium chrysogenum*) no ha quedado modificada. Naturalmente, los cultivos testigo han sido efectuados al mismo tiempo y en las mismas condiciones, lo cual ha planteado problemas experimentales de defícil resolución.

## RIASSUNTO

### AZIONE DEI CAMPI MAGNETICI ED ELETTRICI SULLA CRESCITA E SUL TASSO DI MUTAZIONI DI DIVERSI MICRO-ORGANISMI

L'esperimento effettuato si proponeva di mettere in evidenza una eventuale azione su diversi micro-organismi da parte dei campi elettrici e magnetici generati dalle linee aeree ad altissima tensione nelle loro vicinanze.

Benchè il numero alquanto ridotto dei risultati ottenuti non abbia consentito di fare uno studio statistico, non sono state osservate delle modifiche del tasso di mutazione e del tasso di crescita del ceppo batterico (*Escherichia coli* HfrH) anche impiegando dei campi intensissimi che hanno raggiunto 200 kV/m e 140 gauss. La crescita del ceppo fungico (*Penicillium chrysogenum*) non à stata modificata. Le colture campioni sono state condotte beninteso nello stesso tempo e nelle stesse condizioni il che ha posto dei problemi sperimentali difficili da risolvere.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES


Bowley B. A., 1972. Electrical currents effects on *Escherichia coli* rates. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **139**, 929-934.

Davies B. D., 1948. Isolation of biochemically deficient mutants of bacteria by penicillin. *J. amer. chem. Soc.*, **70**, 4267.

Hedrick H. G., 1964. Inhibition of bacterial growth in homogenous fields In : Barnothy M. F., édit. *Biological effects of magnetic fields*, 240-245, Plenum Press, New-York.

Konig H., Krempl-Lamprecht L., 1959. Über die Einwirkung niederfrequenter elektrischer Felder auf das Wachstum pflanzlicher Organismen. *Arch. Mikrobiol.*, **34**, 204-210.

Lederberg J., Lederberg E. M., 1952. Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. *J. Bacteriol*, **63**, 399-406.

Pareilleux A., Sicard N., 1970. Lethal effects of electric current on *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol.*, **19**, 421-424.

Schemelkonova S. A., Denchev D. D., Badenko L. A., Semenov R. I., 1970. The effect of magnetic fields on *Escherichia coli* K 12. *Biophysica*, **15**, 665-669.

Thiemann W., Wagner E., 1970. The influence of homogenous magnetic fields on the growth of *Micrococcus denitrificans*. *Z. Naturforsch. B.*, **258**, 1020-1023.

Van Nostran S. E., Reinolds J., Hedrick H. G., 1967. Effect of a high magnetic field at different osmotic pressures and temperatures on multiplication of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol.*, **15**, 561-563.

Vergnaud J.-C., 1973. Communication personnelle.

*Ann. Technol. agric.*, 1975, **24** (1), 83-98.

# ÉTUDE D'HUILES ESSENTIELLES D'ORANGE

## I. — Analyse par spectroscopie infrarouge

P. CARMONA, Juana BELLANATO et A. HIDALGO

*Institut d'Optique « Daza de Valdés », C. S. I. C., Serrano, 121, Madrid (Espagne)*

## RÉSUMÉ

On a étudié par spectroscopie infrarouge la composition chimique de 19 échantillons commerciaux d'huile essentielle d'orange douce de diverses origines. Trois échantillons sont fractionnés préalablement par chromatographie en phase liquide sur colonne, pour obtenir des mélanges moins complexes.

On a mis au point une méthode spectroscopique infrarouge de dosage quantitatif du limonène, composé prépondérant dans les huiles brutes.

Les résultats acquis par spectroscopie infrarouge ont été confirmés, dans quelques cas, par chromatographie analytique en phase gazeuse.

Mots clés : *orange, huile essentielle, spectroscopie I.R.*

## INTRODUCTION

Les pourcentages des différents composants des huiles essentielles sont un indice de leur qualité et, en outre, présentent un intérêt particulier puisque, dans certains cas, ce sont des matières premières pour l'obtention des espèces chimiques pures.

Dans les publications de GUENTHER *et al.* (1969, 1971), on peut trouver un certain nombre de travaux sur l'analyse des huiles essentielles d'orange par différentes méthodes.

Dans un travail précédent de notre laboratoire (BELLANATO et HIDALGO, 1971) on a appliqué la spectroscopie infrarouge à l'étude de diverses huiles essentielles, parmi lesquelles on avait inclus des huiles essentielles d'orange.

COLEMAN *et al.* (1969, 1971 *a* et 1971 *b*) ont étudié récemment la composition chimique d'huiles obtenues comme sous-produits de divers types de processus de récupération d'essences d'orange, et LUND *et al.* (1972) ont étudié les fractions aromatiques solubles dans l'eau provenant de l'écorce d'orange. MOSHONAS et LUND

(1969) ont isolé et identifié une série d'aldéhydes α, β-insaturés d'huile obtenue de l'écorce d'orange et postérieurement MOSHONAS *et al.* (1972) ont étudié la distribution des composants aromatiques solubles dans l'eau provenant de diverses parties des fruits. Dans la plupart de ces travaux, on utilise la spectroscopie infrarouge et la spectrométrie de masse pour l'identification de composants séparés par chromatographie en phase gazeuse.

Dans le présent travail, nous utilisons systématiquement la spectroscopie infrarouge pour l'analyse d'huiles essentielles d'orange d'origine espagnole et de trois récoltes. Par comparaison, ont été incluses des huiles essentielles d'autres origines. Pour obtenir des mélanges moins complexes dans lesquels les composants peuvent être déterminés plus aisément, nous avons mis au point une méthode de fractionnement par chromatographie préparative en phase liquide sur colonne qui a été appliquée à l'étude de trois échantillons. Les quatre fractions obtenues ont été postérieurement étudiées par spectroscopie infrarouge et les résultats obtenus pour la fraction éluée par le mélange *n*-hexane-acétate d'éthyle ont été confirmés par chromatographie en phase gazeuse.

La présentation de notre travail peut être divisée en quatre parties :

1. Étude des spectres d'absorption infrarouge des huiles essentielles totales, sur des récoltes de provenances et de processus d'extraction différents.

2. Fractionnement par chromatographie en phase liquide sur colonne ; des groupes de constituants ont été identifiés à l'aide de la spectroscopie infrarouge, dans le cas de trois échantillons espagnols.

3. Mise au point d'une méthode pour la détermination quantitative du limonène dans les huiles brutes.

4. Emploi de la chromatographie analytique en phase gazeuse pour confirmer certains résultats acquis par spectroscopie infrarouge.

Dans une communication ultérieure, nous présenterons les résultats de l'étude d'essences vieillies naturellement au cours du stockage ou par chauffage à différentes températures.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### *Origine des échantillons*

Tous les échantillons étudiés sont commerciaux et extraits d'écorces de fruits des récoltes d'oranges 1970, 1971 et 1972. Ils proviennent : d'une part, de Valence, Murcie, Séville, et d'autre part, du Brésil, d'Israël, de Floride et de Rhodésie.

Les modes d'extraction pour les huiles que nous avons étudiées sont : première pression dans 15 cas, distillation dans un cas et deuxième pression dans un autre cas.

### *Spectroscopie infrarouge*

Les spectres d'absorption infrarouge ont été obtenus sur un spectrophotomètre Perkin-Elmer 457.

Les cellules d'absorption sont préparées d'une façon courante : en film pour les échantillons à l'état liquide ou après dissolution dans le tétrachlorure de carbone. Dans ce dernier cas, les épaisseurs utilisées sont 0,098 mm (déterminée par des mesures interférométriques dans l'infrarouge) et 10 mm (cellule de quartz).

Pour l'étude des échantillons à l'état solide, nous les avons incorporés dans des pastilles de bromure de potassium.

*Chromatographie en phase liquide sur colonne*

Nous avons utilisé la méthode de fractionnement de KIRCHNER et MILLER (1952).

La colonne est en verre, de 45 cm de longueur et 2,5 cm de diamètre, comportant une chemise de réfrigération d'eau. On a employé comme adsorbant le silicagel type Merck d'une taille de grain 0,05-0,2 mm, et comme éluants : *n*-hexane, *n*-hexane-acétate d'éthyle (88 : 12, v : v) acétate d'éthyle et méthanol.

L'élimination ultérieure des éluants est effectuée par distillation sous vide (5 mm de mercure) à 30°C.

Nous avons déterminé par pesée de l'huile et de ses fractions les pertes résultantes qui sont inférieures à 0,3 p. 100.

*Chromatographie analytique en phase gazeuse*

Nous avons employé un chromatographe Perkin-Elmer 990 dans les conditions expérimentales suivantes :

Colonne capillaire de 19 m de longueur et 0,7 mm de diamètre intérieur. Elle est garnie de Chromosorb W-IVAW ; phase stationnaire d'Ucon Fluid LB-550-X ; imprégnation par passage d'une solution de polypropylèneglycol à 0,2 p. 100 dans $Cl_2CH_2$. Débit d'azote : 10 ml/mn ; distribution de flux : 1 : 15. Détecteur à ionisation de flamme ; pression d'hydrogène : 1,2 kg/cm$^2$ ; pression d'air : 2 kg/cm$^2$. Températures de four programmées de 50 à 140°C ; vitesse de programmation 3°C/mn ; temps initial : 0 mn, temps final : 30 mn. Température de l'injecteur : 100°C.

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les figures 1 et 2 donnent les spectres d'absorption infrarouge correspondant à deux échantillons d'huiles essentielles brutes d'oranges cultivées à Valence et Séville, et de la récolte 1971. Le spectre qui correspond à l'échantillon de l'huile de Murcie (1971) est très semblable à celui de Valence (1971).

Le limonène se trouve dans les huiles essentielles brutes à des concentrations de l'ordre de 93 p. 100. Ainsi, la plupart des bandes enregistrées correspondent à ce terpène. Cependant, le myrcène peut être observé par augmentation d'intensité de l'absorption à 1 595 cm$^{-1}$, zone où doit apparaître la bande $\nu C{=}C$ des doubles liaisons conjuguées.

Tous les autres terpènes cités dans les travaux antérieurs (ATTAWAY et PIERINGER, 1967) se trouvent à concentration inférieure à 1 p. 100, ce qui explique qu'ils soient inobservables par cette technique analytique.

La fraction comportant des fonctions oxygénées représente au total environ 5 p. 100 de l'essence et seules sont visibles les bandes les plus intenses, telles que celles du *n*-octanal, *n*-nonanal et *n*-décanal ($\nu C{=}O$ 1 730 cm$^{-1}$), des esters ($\nu C{=}O$ 1 740 cm$^{-1}$) et des flavones : 1 515 cm$^{-1}$ correspondant particulièrement à la présence des doubles liaisons des noyaux aromatiques, et 835 cm$^{-1}$ qui concerne un mode de vibration de déformation $\gamma$C-H du noyau aromatique (LEBRETON et CHOPIN, 1963).

En effet, nous avions attribué auparavant (BELLANATO et HIDALGO, 1971) la bande à 1 515 cm$^{-1}$ au *p*-cymène. Cependant, elle est maintenant attribuée aux flavones, composés qui possèdent un noyau aromatique. La possibilité de présence de *p*-cymène dans l'huile d'orange est infirmée par le spectre infrarouge de la fraction terpénique isolée ; dans cet extrait, on n'observe en effet aucune bande du *p*-cymène.

Les acides aliphatiques (essentiellement caproïque, caprique et caprylique) peuvent être identifiés par la bande correspondant à la vibration de valence $\nu C{=}O$ à 1 720 cm$^{-1}$ qui se superpose à une bande voisine, mais faible, du limonène.

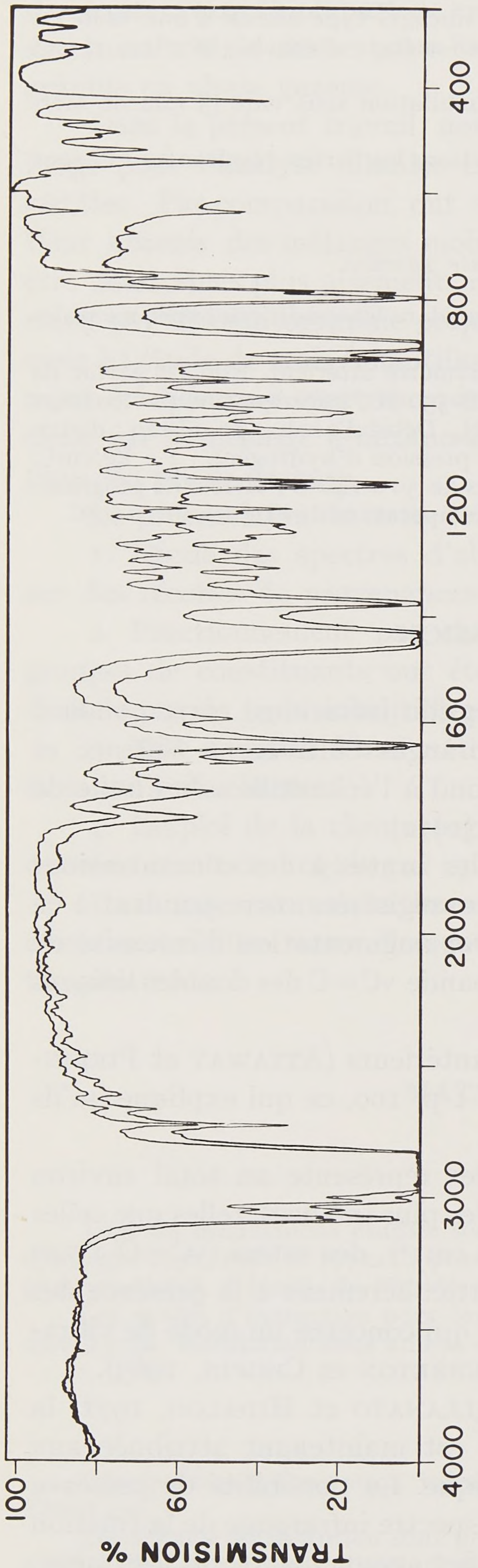



FIG. 1. — *Spectre IR de l'huile essentielle d'orange, Valence* (1971)
l = 0,1 mm et 0,05 mm

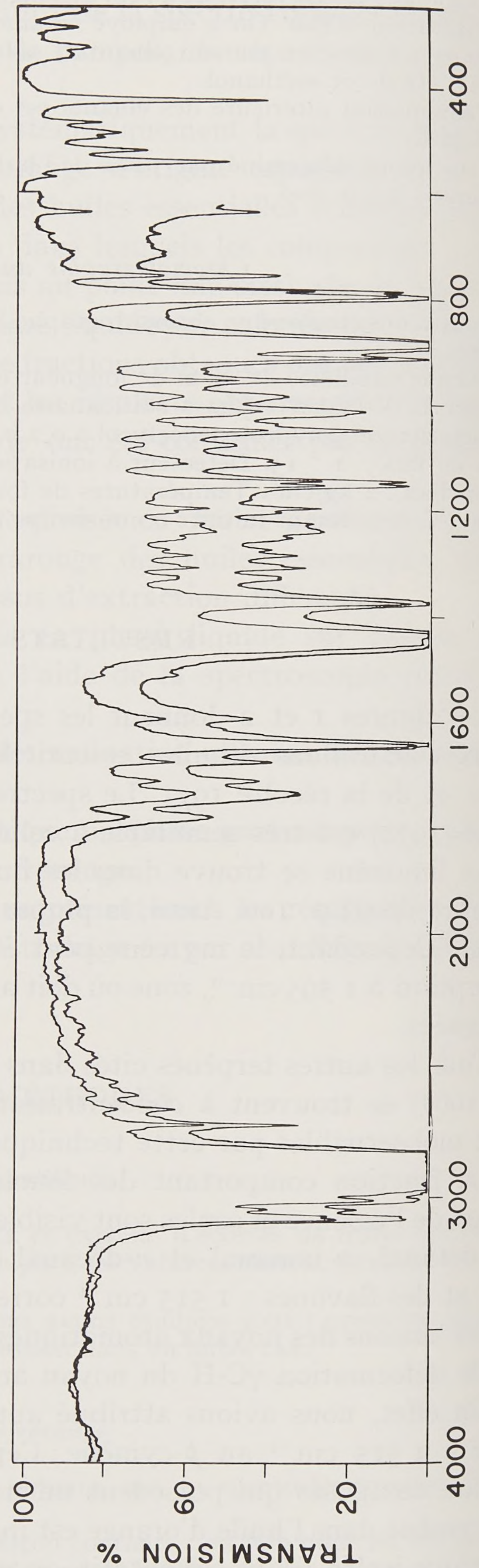



FIG. 2. — *Spectre IR de l'huile essentielle d'orange, Séville* (1971)
l = 0,1 mm et 0,05 mm

*Dosage du limonène et contenu relatif aldéhydes/limonène*

Puisque le limonène se trouve dans ces huiles essentielles à des concentrations généralement supérieures à 90 p. 100, la mesure fondée sur l'absorption de sa bande caractéristique (1 645 $cm^{-1}$) sera très peu affectée par celles des autres composés susceptibles d'interférer.

Pour obtenir une courbe d'étalonnage, nous avons effectué des solutions de limonène dans le tétrachlorure de carbone, avec une échelle de concentrations molaires comprise entre 0,072 et 1,51, dans une cellule d'absorption de 0,098 mm d'épaisseur.

Nous avons ainsi trouvé une équation, ajustée par la méthode de moindres carrés, exprimée de la façon suivante :

$$\frac{D}{l} = 6{,}8\,M + 0{,}081$$

où $D$ est l'absorbance de la bande clef caractéristique à 1 645 $cm^{-1}$, $l$ l'épaisseur de la cellule en mm et $M$ la concentration molaire.

Dans le tableau I sont rassemblés les résultats obtenus pour des échantillons de diverses origines et correspondant à trois récoltes différentes.

TABLEAU I

*Huile essentielle d'orange douce*

Richesse en limonène mesurée par spectroscopie infrarouge.
Contenu relatif aldéhydes/limonène
(Rapport absorbance à 1 730 $cm^{-1}$/absorbance à 1 645 $cm^{-1}$)

| Échantillon (Mode d'extraction) | Origine | Récolte | Limonène (% en poids) | D 1 730 $cm^{-1}$/ D 1 645 $cm^{-1}$ |
|---|---|---|---|---|
| 1. 1re pression | Espagne | 1970 | 89,2 | 0,141 |
| 2. (1) | Espagne | — | 92,9 | 0,100 |
| 3. (1) | Valence | — | 95,4 | 0,046 |
| 4. 1re pression | Valence | — | 93,2 | 0,076 |
| 5. 2e pression | Murcie | — | 89,6 | 0,148 |
| 6. 1re pression | Murcie | — | 92,8 | 0,083 |
| 7. 1re pression | Carcagente | — | 90,5 | 0,120 |
| 8. Distillation | Brésil | — | 94,2 | 0,067 |
| 9. 1re pression | Israël | — | 94,3 | 0,067 |
| 10. 1re pression | Rhodésie | — | 95,1 | 0,046 |
| 11. 1re pression fruit vert | Floride | — | 93,2 | 0,063 |
| 12. 1re pression fruit mûr | Floride | — | 93,5 | 0,061 |
| 13. 1re pression | Valence | 1971 | 93,1 | 0,095 |
| 14. 1re pression | Murcie | — | 95,1 | 0,079 |
| 15. 1re pression | Séville | — | 92,6 | 0,101 |
| 16. 1re pression | Séville | — | 91,5 | 0,136 |
| 17. 1re pression | Floride | — | 95,5 | 0,073 |
| 18. 1re pression | Valence | 1972 | 92,0 | 0,108 |
| 19. 1re pression | Séville | — | 89,1 | 0,153 |

(1) Mode d'extraction non indiqué.

Les aldéhydes aliphatiques présentent la bande caractéristique de la vibration de valence de la fonction carbonyle, $\nu C=O$, presque à la même fréquence ; en outre ils se trouvent en concentration tellement faible qu'il n'est pas possible d'en faire un dosage quantitatif précis. Nous avons réalisé des déterminations différentielles semi-quantitatives en considérant le quotient entre les absorbances des bandes à 1 730 $cm^{-1}$ (*n*-octanal, *n*-nonanal et *n*-décanal principalement, selon l'identification chromatographique) et à 1 645 $cm^{-1}$ (limonène). Les résultats comparatifs pour les différents échantillons sont également donnés dans le tableau 1.

Les pourcentages en poids du limonène dans les huiles brutes et sa concentration relative comparée avec celle des aldéhydes (tabl. 1) ne sont pas caractéristiques de l'origine de l'essence. Cependant, dans les huiles essentielles d'une même année de récolte, on observe que les échantillons de Séville sont moins riches en limonène que ceux qui proviennent de Valence et de Murcie.

### *Fractionnement par chromatographie sur colonne en phase liquide*

Les fractions obtenues de trois échantillons en provenance des fruits cultivés à Valence, Murcie et Séville (échantillons 18, 5 et 19 du tableau 1) ont été pesées, et les pourcentages correspondant aux fractions terpéniques éluées par le *n*-hexane sont respectivement 92 p. 100, 91,3 p. 100 et 90,9 p. 100. Les pourcentages obtenus pour les fractions éluées par le mélange *n*-hexane-acétate d'éthyle sont respectivement 4,9 p. 100, 5,3 p. 100 et 5,7 p. 100. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par spectroscopie infrarouge (tabl. 1), puisque le composant majeur dans la fraction éluée par le *n*-hexane est le limonène (pourcentage supérieur à 97 p. 100), et dans la fraction éluée par le mélange *n*-hexane-acétate d'éthyle les aldéhydes (ATTAWAY, PIERINGER et BARABAS, 1967).

Les pourcentages des fractions éluées par l'acétate d'éthyle sont très proches dans les trois échantillons et de l'ordre de 2,45 p. 100.

Pour les fractions éluées par le méthanol, nous avons obtenu 0,35 p. 100 environ.

### *Interprétation des spectres infrarouges des fractions séparées par chromatographie en phase liquide sur colonne*

*Fraction terpénique éluée par le* n-*hexane.*

La concentration de limonène dans la fraction terpénique de l'huile essentielle d'orange est de l'ordre de 98 p. 100. Ainsi, les bandes caractéristiques de ce composant sont celles qui prédominent dans les spectres d'absorption infrarouge.

Bien que la concentration du myrcène soit très faible (environ 1 p. 100), on pourrait éventuellement déduire de la relation entre les absorbances de la bande à 1 595 $cm^{-1}$ (limonène + myrcène) et à 1 680 $cm^{-1}$ (limonène) une estimation du myrcène existant dans l'essence.

*Fraction éluée par le mélange* n-*hexane-acétate d'éthyle.*

Cette fraction est constituée essentiellement des aldéhydes, esters et alcools. Dans la figure 3, on donne le spectre d'un échantillon (Murcie, récolte 1970).

Les bandes des aldéhydes à chaîne longue, tels que le *n*-octanal et le *n*-décanal (2 930, 2 865, 1 730 et 720 $cm^{-1}$) et celle du groupe carbonyle du citral (1 680 $cm^{-1}$) sont caractéristiques.

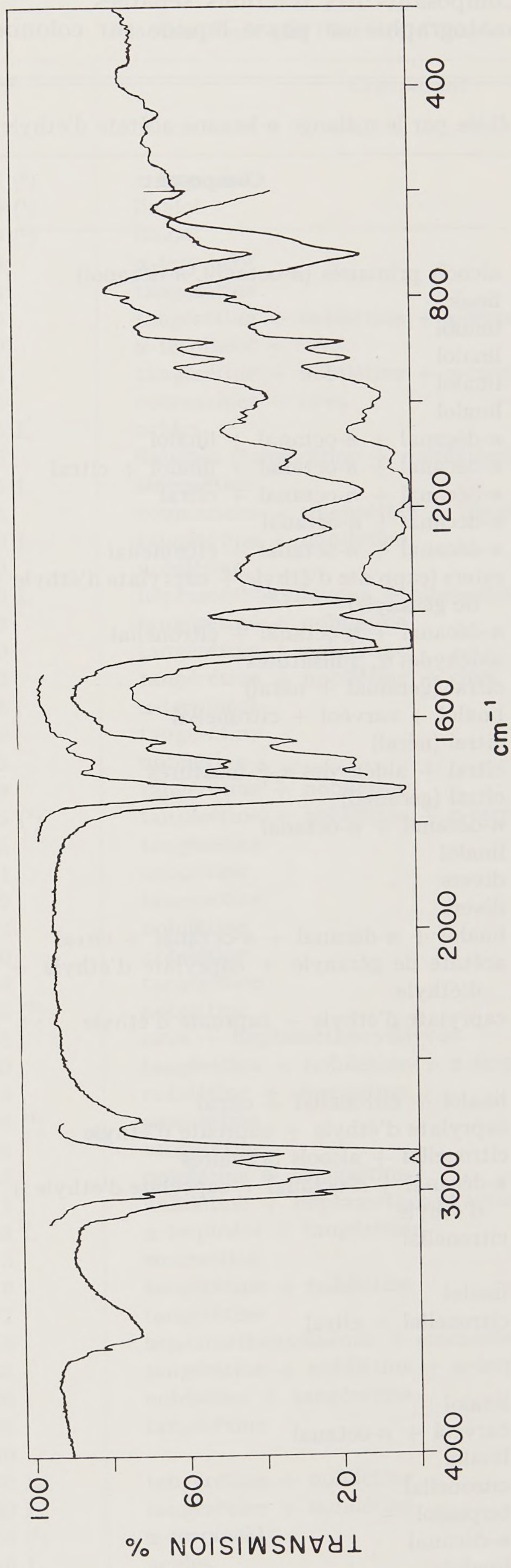



FIG. 3. — *Spectre IR de la fraction éluée avec le mélange* n-*hexane-acétate d'éthyle. Huile essentielle d'orange, Murcie* (1971)

l = 0,1 mm, 0,03 mm et film

TABLEAU 2

*Huile essentielle d'orange*

Composants des fractions séparées
par chromatographie en phase liquide sur colonne

Fraction éluée par le mélange *n*-hexane-acétate d'éthyle

| $cm^{-1}$ | Composant |
|---|---|
| 3 640 L (1) | alcools primaires (*n*-octanol, *n*-décanol) |
| 3 610 (1) | linalol |
| 3 540 (1) | linalol |
| 3 080 | linalol |
| 3 010 | linalol |
| 2 970 L | linalol |
| 2 955 | *n*-décanal + *n*-octanal + linalol |
| 2 925 | *n*-décanal + *n*-octanal + linalol + citral |
| 2 865 | *n*-décanal + *n*-octanal + citral |
| 2 855 | *n*-décanal + *n*-octanal |
| 2 720 | *n*-décanal + *n*-octanal + citronellal |
| 1 740 L | esters (caproate d'éthyle + caprylate d'éthyle + acétate de géranyle) |
| 1 730 | *n*-décanal + *n*-octanal + citronellal |
| 1 692 | aldéhydes α, β-insaturés |
| 1 680 | citral (géranial + néral) |
| 1 642 | linalol + carvéol + citronellal |
| 1 635 L | citral (néral) |
| 1 612 | citral + aldéhydes α, β-insaturés |
| 1 600 | citral (géranial) |
| 1 465 | *n*-décanal + *n*-octanal |
| 1 455 | linalol |
| 1 445 | divers |
| 1 420 | divers |
| 1 380 | linalol + *n*-décanal + *n*-octanal + citral |
| 1 240 | acétate de géranyle + caprylate d'éthyle + caproate d'éthyle |
| 1 170 | caprylate d'éthyle + caproate d'éthyle |
| 1 160 L | |
| 1 140 L | |
| 1 115 | linalol + citronellal + citral |
| 1 100 | caprylate d'éthyle + caproate d'éthyle |
| 1 055 | citronellol + alcools primaires |
| 1 039 | *n*-décanal + *n*-octanal + caprylate d'éthyle + caproate d'éthyle |
| 1 025 | citronellal |
| 1 010 | |
| 995 | linalol |
| 990 | citronellal + citral |
| 980 | |
| 940 | |
| 920 | linalol |
| 886 | carvéol + *n*-octanal |
| 838 | linalol |
| 830 | citronellal |
| 800 | terpinéol |
| 720 | *n*-décanal |
| 690 L | linalol |
| 520 | citronellal |
| 450 | citral |

TABLEAU 2 (*suite*)

Fraction éluée par l'acétate d'éthyle

| $cm^{-1}$ | Composant |
|---|---|
| 3 625 (1) | α-terpinéol |
| 3 610 (1) | linalol |
| 3 540 (1) | linalol |
| 3 430 | α-terpinéol |
| 3 005 | tangérétine |
| 2 960 | tangérétine + nobilétine + α-terpinéol + cires |
| 2 930 | α-terpinéol + cires |
| 2 855 | tangérétine + nobilétine + α-terpinéol + cires |
| 1 735 | coumarines + cires |
| 1 715 L | acides |
| 1 645 | flavones (tangérétine + nobilétine) |
| 1 635 L | sinensétine |
| 1 615 | coumarines + sinensétine + tangérétine |
| 1 590 L | tangérétine + nobilétine |
| 1 560 | nobilétine |
| 1 520 L | heptaméthoxyflavone + sinensétine |
| 1 513 | tangérétine + nobilétine |
| 1 480 | tangérétine + nobilétine |
| 1 462 | tangérétine + nobilétine + cires |
| 1 448 | α-terpinéol |
| 1 438 | tangérétine |
| 1 425 | nobilétine |
| 1 409 | tangérétine + nobilétine |
| 1 375 (1) | tangérétine + nobilétine + α-terpinéol |
| 1 365 | tangérétine |
| 1 331 | nobilétine |
| 1 309 | tangérétine |
| 1 302 | nobilétine |
| 1 280 | nobilétine |
| 1 268 | tangérétine |
| 1 255 (1) | nobilétine |
| 1 245 | cires + heptaméthoxyflavone |
| 1 220 | tangérétine + nobilétine + α-terpinéol |
| 1 210 | nobilétine + sinensétine |
| 1 200 (1) | sinensétine |
| 1 180 | tangérétine |
| 1 165 | nobilétine + sinensétine |
| 1 145 | nobilétine + heptaméthoxyflavone |
| 1 135 L | α-terpinéol + tangérétine |
| 1 115 | sinensétine |
| 1 110 | tangérétine + nobilétine |
| 1 077 | tangérétine |
| 1 055 | heptaméthoxyflavone + sinensétine |
| 1 038 | tangérétine + nobilétine + α-terpinéol |
| 1 020 | nobilétine + tangérétine |
| 1 008 | tangérétine |
| 980 | |
| 970 L | tangérétine + nobilétine |
| 960 L | tangérétine + nobilétine |
| 950 (1) | α-terpinéol |
| 940 L | acides |
| 920 L | α-terpinéol |
| 910 | nobilétine + α-terpinéol |

TABLEAU 2 *(suite)*

| Fraction éluée par l'acétate d'éthyle | |
|---|---|
| $cm^{-1}$ | Composant |
| 892 | tangérétine |
| 870 | sinensétine |
| 860 | nobilétine + heptaméthoxyflavone |
| 835 | tangérétine + nobilétine + α-terpinéol |
| 802 | nobilétine + sinensétine |
| 798 L | α-terpinéol + tangérétine |
| 778 | α-terpinéol + sinensétine |
| 770 | nobilétine + α-terpinéol |
| 748 | nobilétine + sinensétine + coumarines |
| 720 | cires + nobilétine + sinensétine |
| 688 | sinensétine + heptaméthoxyflavone |
| 655 | tangérétine |

L : épaulement.
(1) Spectres effectués en solution dans le $CCl_4$.

Les aldéhydes α, β-insaturés à chaîne linéaire tels que le 2-hexène-1-al, 2-octène-1-al et 2-dodécène-1-al peuvent être reconnus par la bande à 1 692 $cm^{-1}$. Les aldéhydes à chaîne ramifiée, tels que les α, β-dialkylacroléines, absorbent aussi dans la même zone et ont été identifiés récemment dans l'huile essentielle d'orange (MOSHONAS et LUND, 1969). La relation entre les absorbances des bandes à 1 692 et 1 680 $cm^{-1}$ dépend de la proportion de ces aldéhydes par rapport au citral.

Les esters normaux absorbent autour de 1 740 $cm^{-1}$ (νC=O) ; mais, cette absorption se superpose à celle des aldéhydes linéaires. Cependant, il existe d'autres bandes caractéristiques qui permettent l'identification de ces composés estérifiés : 1 240, 1 170 et 1 100 $cm^{-1}$, par exemple.

Sur le profil infrarouge de cette fraction peuvent aussi être repérés divers alcools par des bandes relativement spécifiques du linalol (3 610 et 3 540 $cm^{-1}$ (νO-H) en solution diluée dans $CCl_4$) et du carvéol (1 642 (νC=C) et 890 (γC—H) $cm^{-1}$, bandes caractéristiques de la double liaison terminale).

En particulier, l'étude de la région νO—H sur des solutions très diluées (avec cellules de 1 ou 4 cm d'épaisseur), permet la détection d'autres alcools. Ainsi, les alcools primaires, du type : octanol, nonanol, etc., donnent lieu à un épaulement à 3 640 $cm^{-1}$. Le déplacement de la bande du linalol à 3 610 $cm^{-1}$ vers des fréquences plus grandes, ainsi que l'augmentation relative des absorbances des bandes à 3 610 et 3 540 $cm^{-1}$, peuvent donner des informations sur la présence d'alcools tels que le géraniol et le citronellol ; ceci peut aussi se confirmer en considérant d'autres régions du spectre.

Dans le tableau 2 sont rassemblés les nombres d'onde des bandes enregistrées ainsi que les assignations correspondantes.

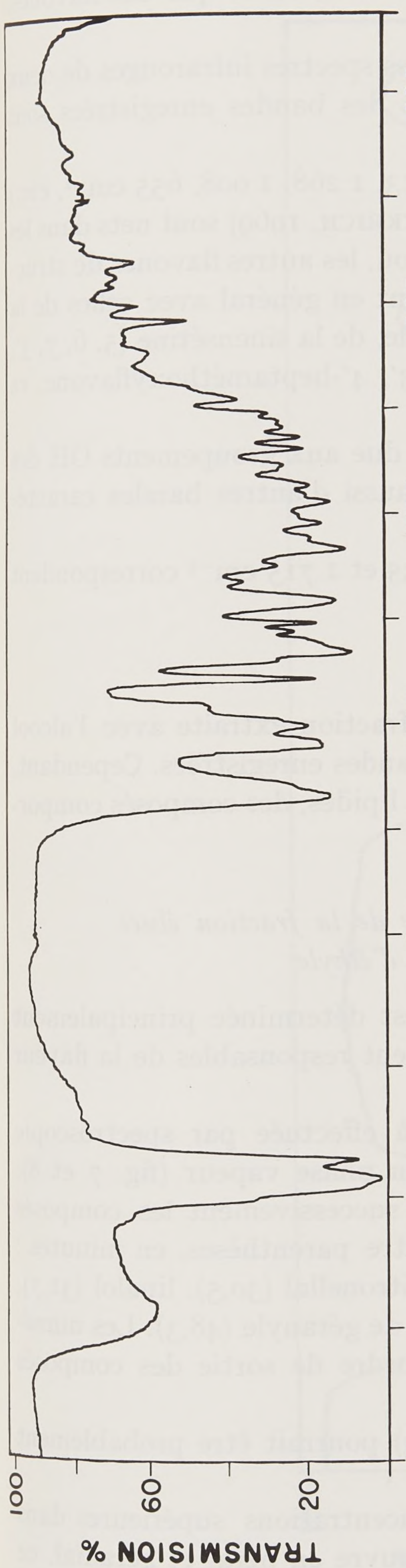



FIG. 4. — *Spectre IR de la fraction éluée avec l'acétate d'éthyle, en film. Huile essentielle d'orange, Valence* (1972)

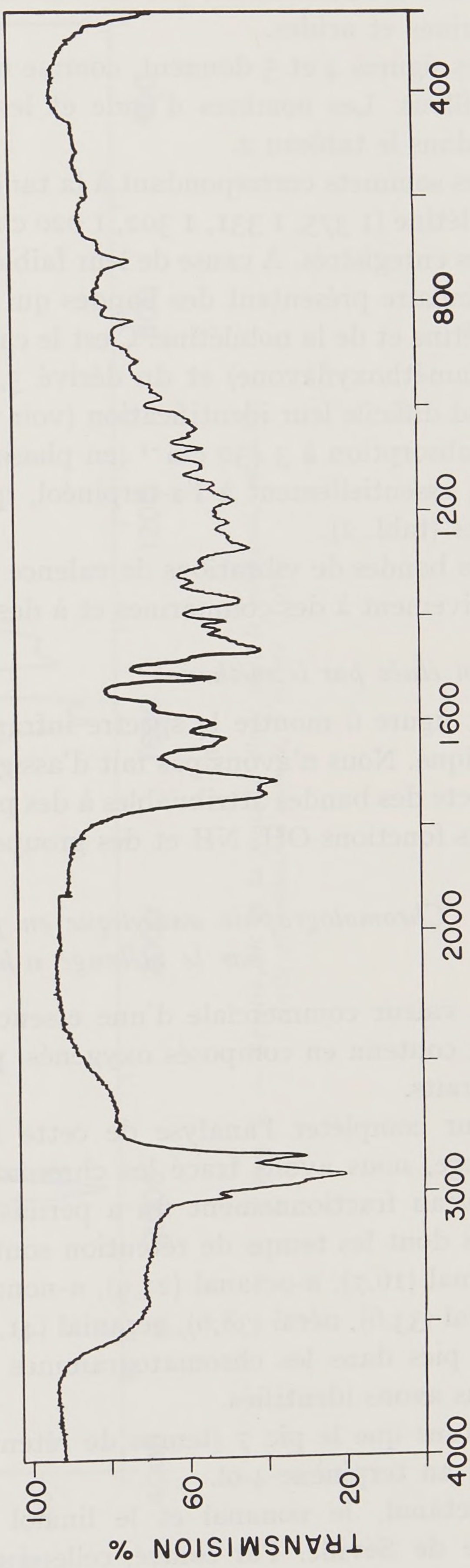



FIG. 5. — *Spectre IR de la fraction éluée avec l'acétate d'éthyle, en film. Huile essentielle d'orange, Séville* (1972)

*Fraction éluée par l'acétate d'éthyle.*

Avec ce solvant, on extrait dans la colonne chromatographique une fraction constituée essentiellement par les substances non volatiles, telles que des flavones, coumarines et acides.

Les figures 4 et 5 donnent, comme un exemple, les spectres infrarouges de deux échantillons. Les nombres d'onde et les assignations des bandes enregistrées sont inclus dans le tableau 2.

Les sommets correspondant à la tangérétine (1 513, 1 268, 1 008, 655 $cm^{-1}$, etc.) et nobilétine (1 375, 1 331, 1 302, 1 020 $cm^{-1}$, etc.) (Unkrich, 1969) sont nets dans les spectres enregistrés. A cause de leur faible concentration, les autres flavones de structure similaire présentent des bandes qui se superposent en général avec celles de la tangérétine et de la nobilétine. C'est le cas, par exemple, de la sinensétine (5, 6, 7, 3', 4'-pentaméthoxyflavone) et du dérivé 3, 5, 6, 7, 8, 3', 4'-heptaméthoxyflavone, ce qui rend difficile leur identification (voir tabl. 2).

L'absorption à 3 430 $cm^{-1}$ (en phase liquide) est due aux groupements OH des alcools, essentiellement à l'α-terpinéol, qui présente aussi d'autres bandes caractéristiques (tabl. 2).

Les bandes de vibrations de valence $\nu C{=}O$ à 1 735 et 1 715 $cm^{-1}$ correspondent respectivement à des coumarines et à des acides.

*Fraction éluée par le méthanol.*

La figure 6 montre le spectre infrarouge d'une fraction extraite avec l'alcool méthylique. Nous n'avons pas fait d'assignation des bandes enregistrées. Cependant, on détecte des bandes attribuables à des paraffines, des lipides, des composés comportant des fonctions OH, NH et des groupes insaturés.

### *Chromatographie analytique en phase gazeuse de la fraction éluée par le mélange* n-*hexane-acétate d'éthyle*

La valeur commerciale d'une essence d'orange est déterminée principalement par son contenu en composés oxygénés, particulièrement responsables de la flaveur des extraits.

Pour compléter l'analyse de cette fraction, déjà effectuée par spectroscopie infrarouge, nous avons tracé les chromatogrammes en phase vapeur (fig. 7 et 8). Ce nouveau fractionnement fin a permis d'identifier successivement les composés suivants dont les temps de rétention sont indiqués entre parenthèses, en minutes : *n*-heptanal (16,7), *n*-octanal (21,9), *n*-nonanal (27,5), citronellal (30,5), linalol (31,7), *n*-décanal (33,6), néral (38,6), géranial (41,8) et acétate de géranyle (48,3). Les numéros des pics dans les chromatogrammes indiquent l'ordre de sortie des composés que nous avons identifiés.

Notons que le pic 7 (temps de rétention 35,1 mn) pourrait être probablement attribué au terpinène-4-ol.

L'octanal, le nonanal et le linalol sont en concentrations supérieures dans l'essence de Séville. Par contre, celle-ci est la plus pauvre en néral et géranial, ce qui confirme les résultats déjà obtenus par spectroscopie infrarouge sur le contenu relatif en citral (néral + géranial) et aldéhydes aliphatiques des extraits d'oranges considérés.

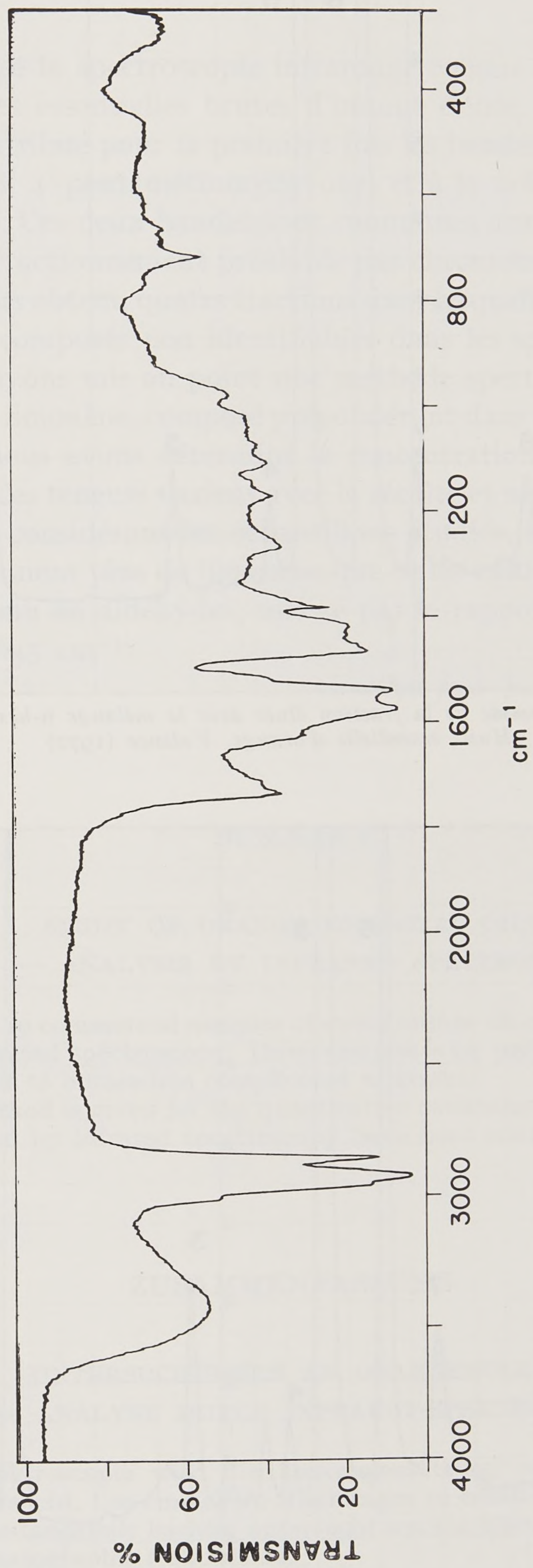



Fig. 6. — *Spectre IR de la fraction éluée avec le méthanol, en KBr. Huile essentielle d'orange, Valence* (1972)

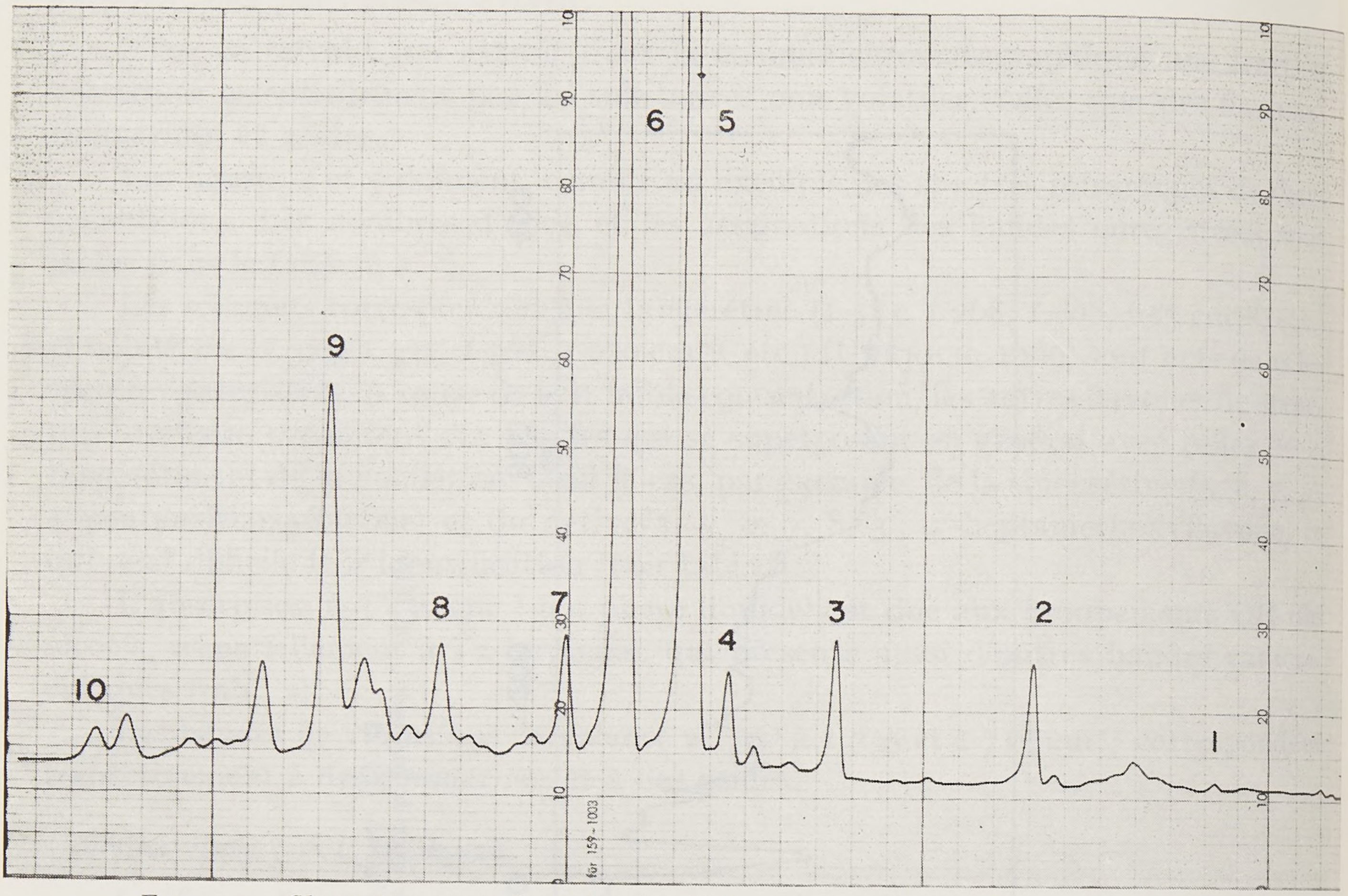



FIG. 7. — *Chromatogramme de la fraction éluée avec le mélange* n-*hexane-acétate d'éthyle. Huile essentielle d'orange, Valence* (1972)




FIG. 8. — *Chromatogramme de la fraction éluée avec le mélange* n-*hexane-acétate d'éthyle. Huile essentielle d'orange, Séville* (1972)

## CONCLUSIONS

Nous avons utilisé la spectroscopie infrarouge comme méthode d'identification directe dans les huiles essentielles brutes d'orange douce. Dans les spectres infrarouges, nous avons attribué pour la première fois les bandes à 1 515 et 835 $cm^{-1}$ à la tangérétine (5, 6, 7, 8, 4'-pentaméthoxyflavone) et à la nobilétine (5, 6, 7, 8, 3', 4'-hexaméthoxyflavone). Ces deux bandes sont communes aux deux composés.

Au moyen d'un fractionnement préalable par chromatographie en phase liquide sur colonne, nous avons obtenu quatre fractions dans lesquelles on détecte par spectroscopie infrarouge 16 composés non identifiables dans les spectres des huiles brutes.

En outre, nous avons mis au point une méthode spectroscopique infrarouge de dosage quantitatif du limonène, composé prépondérant dans les huiles brutes d'orange. Par cette méthode, nous avons déterminé la concentration en limonène de tous les échantillons étudiés. Ces teneurs varient avec la récolte et ne sont pas caractéristiques de l'origine. Mais, en considérant les échantillons étudiés, les huiles d'oranges cultivées à Valence contiennent plus de limonène que celles cultivées à Séville, et inversement pour leur contenu en aldéhydes, estimé par le rapport d'absorbance entre les bandes à 1 730 et 1 645 $cm^{-1}$.

*Reçu pour publication en mars 1975.*


## SUMMARY

### STUDY OF ORANGE ESSENTIAL OILS.
### I. — ANALYSIS BY INFRARED SPECTROSCOPY

The composition of 19 commercial samples of sweet orange oil cultivated in different regions has been studied by infrared spectroscopy. Three samples were previously separated by column chromatography in order to obtain less complicated mixtures.

A spectroscopic method is given for the quantitative determination of limonene.

The results obtained by infrared spectroscopy have been confirmed in some cases by gas chromatography.



## ZUSAMMENFASSUNG

### UNTERSUCHUNGEN AN ORANGENOLEN.
### I. — ANALYSE DURCH INFRAROT-SPEKTROSCOPIE

Durch Infrarot-Spektroscopie wird die Zusammensetzung von 19 Handelsmustern von Orangenölen (süss) untersucht. Um einfachere Mischungen zu erhalten, in denen die in geringeren Mengen vorhandenen Bestandsteile leichter untersucht werden könnten, hat man drei atherische Oele durch Säulenchromatographie fraktioniert.

Man hat ebenfalls eine spektroskopische Analyse-methode zur quantitativen Bestimmung von Limonenen ausgearbeitet.

Die durch Infrarot-Spektroscopie erhaltenen Ergebnisse werden in einigen Fällen durch Gaschromatographie bestätigt.

## RESUMEN


ESTUDIO DE ACEITES ESENCIALES DE NARANJA.
I. — ANÁLISIS POR ESPECTROSCOPÍA INFRARROJA

Se ha estudiado, por espectroscopía infrarroja, la composición química de 19 muestras comerciales de aceite esencial de naranja dulce de diversos orígenes. A fin de obtener mezclas menos complejas tres muestras fueron fraccionadas por cromatografia en columna.

Se ha puesto a punto un método espectroscópico de valoración cuantitativa del limoneno.

En algunos casos, los resultados obtenidos por espectroscopía infrarroja han sido confirmados por cromatografia en fase gaseosa.


## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES


Attaway J. A., Pieringer A. P., Barabas L. J., 1967. The origin of citrus flavor components. III. A study of the percentage variations in peel and leaf oil terpenes during one season. *Phytochem.*, **6**, 25-32.

Bellanato J., Hidalgo A., 1971. *Infrared analysis of essential oils.* Heyden and Son Ltd., London, 1971.

Coleman R. L., Lund E. D., Moshonas M. G., 1969. Composition of orange essence oil. *J. Food Sci.*, **34**, 610-611.

Coleman R. L., Shaw P. E., 1971 *a*. Analysis of Valencia orange essence and aroma oils. *J. Agr. Food Chem.*, **19**, 520-523.

Coleman R. L., Shaw P. E., 1971 *b*. Quantitative analysis of a highly volatile fraction from Valencia orange essence oil. *J. Agr. Food Chem.*, **19**, 1276-1279.

Guenther E., Gilbertson G., Koenig R. T., 1969. Essential oils and related products. *Anal. Chem.*, **41** (5), 40 R.

Guenther E., Gilbertson G., Koenig R. T., 1971. Essential oils and related products. *Anal. Chem.*, **43** (5), 45 R.

Kirchner J. G., Miller J. M., 1952. Preparation of terpeneless essential oils. A chromatographic process. *Ind. Eng. Chem.*, **44**, 318-321.

Lebreton P., Chopin J., 1963. Contribution à l'étude spectrographique infrarouge des composés flavoniques. *Spectrochim. Acta*, **19**, 2099-2112.

Lund E. D., Berry R. E., Wagner C. J., Veldhuis M. K., 1972. Quantitative composition studies of water-soluble aromatics from orange peel. *J. Agr. Food Chem.*, **20**, 685-687.

Moshonas M. G., Lund E. D., 1969. Isolation and identification of a series of α, β-unsaturated aldehydes from Valencia orange peel oil. *J. Agr. Food Chem.*, **17**, 802-804.

Moshonas M. G., Lund E. D., Berry R. E., Veldhuis M. K., 1972. Distribution of aqueous aroma components in the orange. *J. Agr. Food. Chem.*, **20**, 688-690.

Unkrich G., 1969. *Die methoxylierten Flavone in Citrus aurantium L. subspecies amara L. und anderen Citrusarten.* Inaugural-Dissertation. Bildstelle der J. W. Goethe-Universität, Frankfurt a. M.

*Ann. Technol. agric.*, 1975, **24** (1), 99-110.

# AUTOMATISATION DU DOSAGE DES ACIDES URONIQUES PAR LA MÉTHODE AU CARBAZOL. APPLICATION AU CAS DES MATIÈRES PECTIQUES

J.-F. THIBAULT et J.-P. ROBIN

*Station de Biochimie et Physicochimie des Céréales,*
*C. E. R. D. I. A., I. N. R. A.,*
*91305 Massy*

## RÉSUMÉ

Le schéma de l'automatisation du dosage des acides uroniques par la méthode au carbazol de McComb et McCready est décrit. Cette méthode automatique appliquée au cas des matières pectiques, permet le dosage de 10 échantillons de pectines, préalablement désestérifiées, par heure. La consommation en acide sulfurique est peu importante, la précision et la sensibilité du dosage sont suffisantes et les risques d'interférences peu importants. Cette méthode automatique a été aussi adaptée à la détection en continu des matières pectiques en sortie de colonne chromatographique.

Mots clés : *acides uroniques, pectines, carbazol, automatisation.*

Les acides uroniques sont dosés le plus généralement par des méthodes colorimétriques dont le principe repose sur la réaction des dérivés furfuriques, obtenus par l'action à chaud d'un acide concentré, avec divers réactifs à cycles aromatiques. Ainsi, Khym et Doherty (1952) emploient l'orcinol, Rahman et Joslyn (1953) le naphtorésorcinol, Helbert et Brown (1959) l'anthrone, Blumenkrantz et Asboe-Hansen (1973) le métahydroxydiphényl, Wardi *et al.* (1974) l'harmine.

En fait, les méthodes basées sur l'emploi de tels réactifs sont peu mises en pratique par rapport à celles utilisant le carbazol en milieu sulfurique. Ce réactif a été employé pour la première fois en 1947 dans la méthode décrite par Dische, méthode rendue plus rapide en 1952 par McComb et McCready. En 1962, Bitter et Muir pensent apporter une nouvelle modification à la méthode de Dische en ajoutant au milieu réactionnel des ions borate pour accroître l'intensité de la coloration obtenue avec les acides uroniques. Mais, d'après Montreuil et Spik (1963), cette modification diminuait plus la spécificité de la réaction en augmentant les

interférences dues aux oses neutres qu'elle n'exaltait l'intensité de la coloration propre aux acides uroniques.

Jusqu'à présent, très peu d'auteurs se sont préoccupés de l'automatisation de la méthode au carbazol. En tant que moyen de détection automatique des acides uroniques contenus dans l'effluent d'une colonne chromatographique, la méthode au carbazol de BITTER et MUIR a été utilisée par JOHNSON et SAMUELSON (1966) puis par STACEY et SOMERS (1969), ces derniers indiquant le schéma d'automatisation de la méthode sans toutefois préciser ni les débits, ni la composition des réactifs.

En tant que moyen de dosage automatique et quantitatif des acides uroniques, la méthode au carbazol a été automatisée par BALAZS *et al.* (1965) pour doser les acides glucuronique et iduronique, puis par KNEE en 1973 pour doser l'acide galacturonique et les pectines. Les manifolds utilisés dans les modes opératoires proposés par ces derniers auteurs ont l'inconvénient de provoquer d'une part une consommation importante en acide sulfurique et d'autre part des interférences non négligeables avec les oses neutres. Ce dernier inconvénient provient en général du choix de la méthode de BITTER et MUIR pour l'automatisation du dosage.

Pour ces raisons, nous nous sommes attachés à l'automatisation de la méthode de McCOMB et McCREADY de manière à réduire autant que possible les interférences avec les oses neutres et la consommation en acide sulfurique.

Cette étude a été effectuée dans le but de mettre au point une méthode automatique de dosage des matières pectiques, polymères essentiellement constitués par un enchaînement d'unités anhydro-galacturoniques liées en $\alpha$ — 1,4, dont les fonctions acides sont plus ou moins estérifiées par du méthanol.

La méthode mise au point n'est pas spécifique de l'acide galacturonique ; elle permet le dosage des autres acides uroniques dans la mesure où, du fait de la diminution de la sensibilité du dosage des acides uroniques autres que les acides galacturonique et glucuronique, l'interférence des oses neutres reste négligeable.

## I. — MÉTHODE PROPOSÉE

### A. — *Principe*

L'acide galacturonique se transforme, par chauffage en milieu acide concentré, en acide 5-formyl-furoïque (BOWNESS, 1958) qui se condense avec le carbazol pour former un complexe coloré pourpre, peu stable en fonction du temps (McCOMB et McCREADY), présentant un maximum d'absorption vers 520-530 nm.

Dans le cas des substances pectiques, l'acide sulfurique hydrolyse préalablement ces polymères en acides galacturoniques avant de les transformer en dérivés furfuriques.

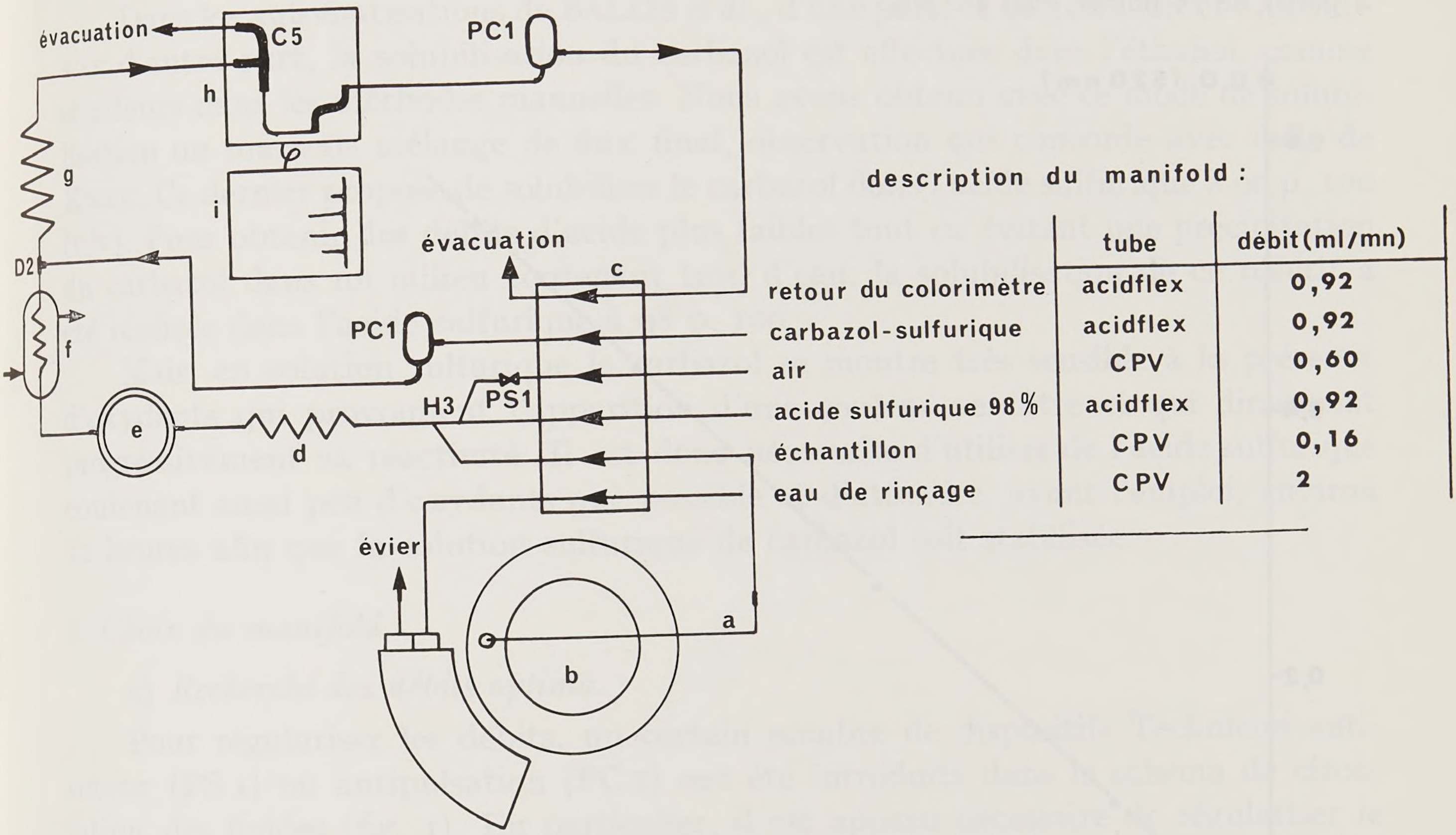
### B. — *Réactifs*

- — acide sulfurique à 98 p. 100, $d = 1{,}83$ (Prolabo ou Baker) ;
- — solution de carbazol pur (Prolabo) à 1 g par litre d'acide sulfurique à 98 p. 100 : attendre environ 12 heures avant d'employer cette solution ;
- — acide galacturonique monohydraté (Baker) ;
- — pectine commerciale [1].

[1] « Genu-pectine » gracieusement fournie par la Société Kobenhavns Pektinfabrik (Danemark) que nous remercions.

### C. — *Appareillage*

Un autoanalyseur Technicon a été utilisé. Il comprend un distributeur d'échantillons, une pompe proportionnante, un bain thermostaté à 98°C muni d'une bobine de délai d'environ 12 mètres, un colorimètre avec un jeu de filtres interférentiels de 520 mn, muni d'une cuve tubulaire à flux continu de 15 mm de longueur et un enregistreur. Le schéma d'automatisation est indiqué sur la figure 1.




| | tube | débit (ml/mn) |
|---|---|---|
| retour du colorimètre | acidflex | 0,92 |
| carbazol-sulfurique | acidflex | 0,92 |
| air | CPV | 0,60 |
| acide sulfurique 98 % | acidflex | 0,92 |
| échantillon | CPV | 0,16 |
| eau de rinçage | CPV | 2 |

FIG. 1. — *Schéma d'automatisation du dosage de l'acide galacturonique et des pectines* (ou d'autres acides uroniques et polyuronides) *par la méthode au carbazol*

*a* : tube de prélèvement de l'échantillon
*b* : échantillonneuse (came 10-1/3)
*c* : pompe proportionnante
*d* : bobine simple de mélange
*e* : bain thermostaté à 98°C
*f* : bobine de refroidissement
*g* : bobine de délai
*h* : colorimètre 520 nm
*i* : enregistreur

PCl = chambre antipulsation,
PSl = dispositif antiretour

### D. — *Mode opératoire*

Le distributeur d'échantillons, pourvu d'un bac de rinçage alimenté par de l'eau distillée ou permutée, permet grâce à une came 10-1/3 le dosage de 10 échantillons par heure (temps de pompage de l'échantillon de 90 secondes, temps de rinçage de 270 secondes).

L'échantillon est prélevé par un capillaire relié au tube de pompage. A la sortie de la pompe, l'échantillon est mis en présence de l'acide sulfurique à 98 p. 100 préalablement segmenté par l'air. Le milieu réactionnel se mélange alors dans une bobine simple avant de séjourner environ 20 minutes dans un bain thermostaté à 98°C. Puis après refroidissement, il est mélangé avec la solution sulfurique de carbazol. Une nouvelle bobine de délai de 12 mètres environ, mise en série, permet le développement de la coloration (temps de séjour de l'ordre de 20 mn). Après débullage, la densité optique du flux est enregistrée à 520 nm, au bout d'un temps bien défini et parfaitement reproductible. Ceci annule donc les erreurs dues à l'instabilité de la coloration et constitue un avantage important du dosage automatique par rapport au dosage manuel.

E. — *Étalonnage*

L'acide galacturonique est dissous dans de l'eau permutée à raison de 1 mg d'acide galacturonique anhydre par ml d'eau. A partir de la solution-mère ainsi préparée, des dilutions sont effectuées de façon à obtenir des solutions dont la concentration en acide galacturonique varie de 0 à 200 µg/ml.

La courbe d'étalonnage obtenue (fig. 2) suit la loi de Beer-Lambert jusqu'à une concentration en acide galacturonique voisine de 200 µg/ml, avec un coefficient de corrélation, calculé à partir de 19 points, égal à 0,999.

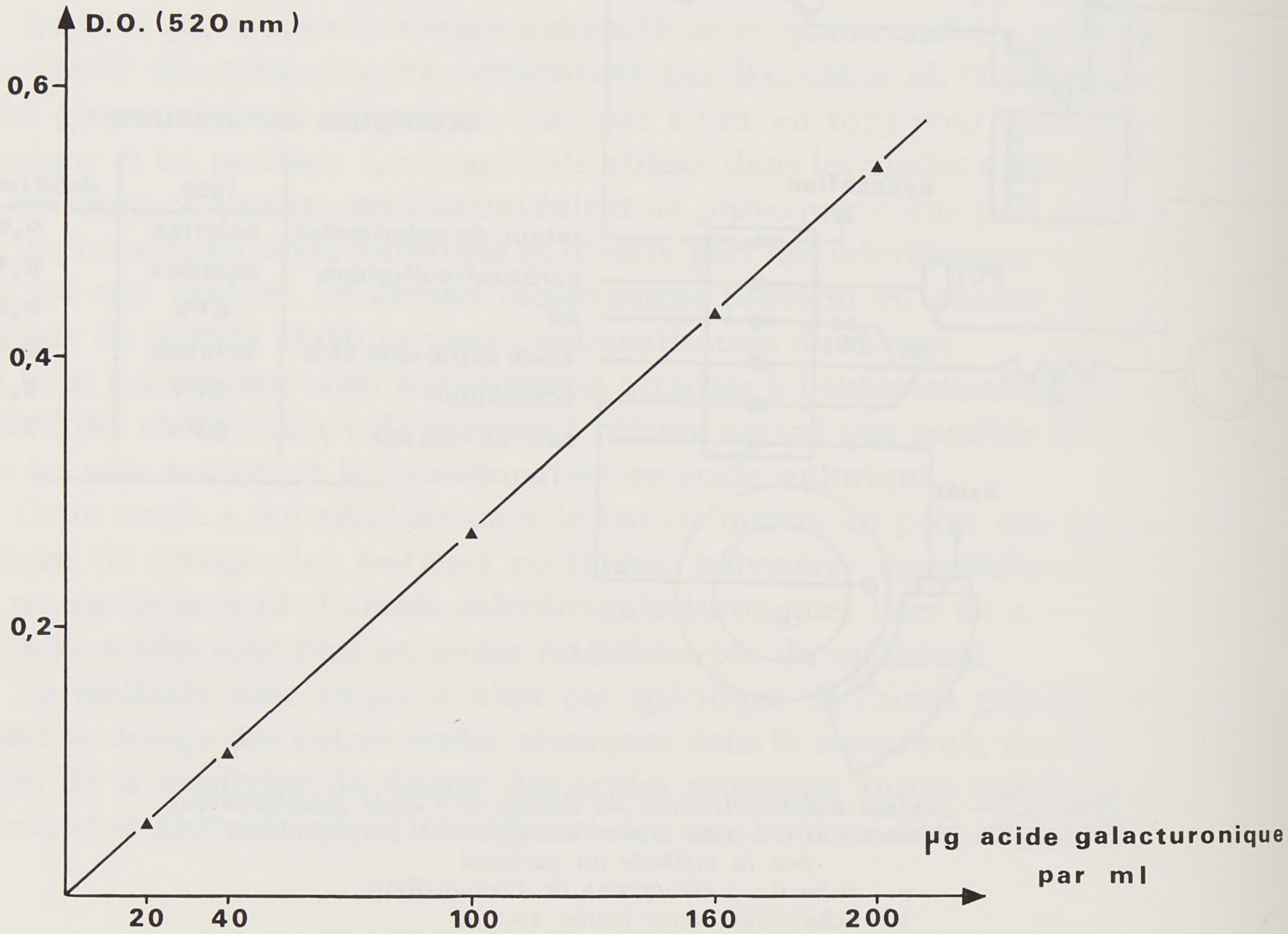



Fig. 2. — *Courbe d'étalonnage : relation entre la densité optique mesurée à* 520 *nm et la concentration en acide galacturonique* (moyenne de deux points)

La sensibilité de la méthode, égale à 2 µg/ml, est supérieure à celle que l'on obtient avec la méthode manuelle (4 µg/ml).

La reproductibilité, que nous avons exprimée par l'écart maximum par rapport à la valeur moyenne, entre les pentes de droites d'étalonnage obtenues après renouvellement des solutions étalons, des réactifs et des tubes de pompage, est de 10 p. 100. Il convient donc de faire l'étalonnage avant chaque série de dosages.

F. — *Expression des résultats*

Soient $m$, le poids (en µg) d'acide galacturonique relevé sur la droite d'étalonnage ;
M, le poids (en mg) de l'échantillon de pectine analysé ;
$f$, le facteur de dilution (la dilution doit être telle que 1 ml de solution à analyser contienne l'équivalent de 2 à 200 µg d'acide galacturonique) ;
et 0,93, le facteur théorique de conversion acide galacturonique / acide anhydro-galacturonique.

Le pourcentage d'acide anhydro-galacturonique de l'échantillon analysé est égal à :

$$\frac{m \times 10^{-3} \times 0{,}93}{M} \times f \times 100$$

## II. — RÉSULTATS ET DISCUSSION

### A. — *Justification du mode opératoire*

1. *Solubilisation du carbazol.*

Dans les automatisations de Balazs *et al.*, d'une part, et de Johnson et Samuelson d'autre part, la solubilisation du carbazol est effectuée dans l'éthanol, comme d'ailleurs dans les méthodes manuelles. Nous avons obtenu avec ce mode de solubilisation un mauvais mélange de flux final, observation qui concorde avec celle de Knee. Ce dernier propose de solubiliser le carbazol dans l'acide sulfurique à 90 p. 100 (v/v). Pour obtenir des débits d'acide plus faibles tout en évitant une précipitation du carbazol dans un milieu contenant trop d'eau, la solubilisation de ce réactif a été réalisée dans l'acide sulfurique à 98 p. 100.

Mais, en solution sulfurique le carbazol se montre très sensible à la présence d'oxydants qui provoquent l'apparition d'une couleur verdâtre et qui diminuent progressivement sa réactivité. Il est donc nécessaire d'utiliser de l'acide sulfurique contenant aussi peu d'oxydants que possible et d'attendre, avant l'emploi, environ 12 heures afin que la solution sulfurique de carbazol soit stabilisée.

2. *Choix du manifold.*

a) *Recherche des débits optima.*

Pour régulariser les débits, un certain nombre de dispositifs Technicon anti-retour (PS 1) ou antipulsation (PC 1) ont été introduits dans le schéma de circulation des fluides (fig. 1). En particulier, il est apparu nécessaire de régulariser le débit de la solution de carbazol par un dispositif antipulsation. Avec le manifold que nous proposons, la consommation en acide sulfurique est égale à 1,84 ml/mn alors qu'avec celui décrit par Balazs *et al.*, ou par Knee, elle est respectivement égale à 2,34 ou 3,95 ml/mn. Par rapport à ces dernières, la consommation est donc réduite de plus de 20 et 50 p. 100, bien que le nombre d'échantillons dosés par heure soit le même dans les trois cas.

b) *Recherche des interférences minimales des oses neutres.*

Avant d'adopter définitivement le manifold représenté par la figure 1 (noté manifold 1), nous avions tenté de le simplifier comme le propose Vijayalakshmi (1974) en solubilisant directement le carbazol dans l'acide sulfurique qui a pour but d'hydrolyser les substances pectiques et de transformer les acides galacturoniques obtenus en dérivés furfuriques ; de ce fait, la solution sulfurique de carbazol était mélangée à l'échantillon dès la sortie de la pompe et passait aussitôt dans le bain thermostaté à 98°C : la réaction colorée s'effectuait donc à chaud. Le tableau 1 montre que l'utilisation d'un tel manifold « modifié » (noté manifold 2) provoque une augmentation très importante des interférences avec les oses neutres, ce qui nous a conduit à l'abandonner.

Les interférences provoquées par les oses neutres sur le dosage de l'acide galacturonique par la méthode automatique telle que nous la proposons (manifold 1) sont sensiblement les mêmes que celles observées manuellement par Montreuil et

TABLEAU I

*Densités optiques relatives*
(mesurées par rapport à celle de l'acide galacturonique en concentration égale)
*des colorations données par divers oses neutres avec plusieurs variantes de la méthode au carbazol*

| | Dosage manuel MONTREUIL et SPIK (1) | Dosage automatique | | |
|---|---|---|---|---|
| | | KNEE (2) | Manifold 1 (3) | Manifold 2 (4) |
| Acide galacturonique ..... | 100 | 100 | 100 | 100 |
| Glucose .................. | 8,6 | 15,4 | 10,6 | 42,2 |
| Galactose ................ | 5,2 | 6,5 | 7,7 | 26,6 |
| Xylose ................... | 0 | 5,7 | < 1,8 | 45,3 |
| Arabinose ................ | 0 | 2,4 | < 1,8 | 29 |
| Rhamnose ................. | 0 | — | < 1,8 | 28,4 |

(1) Méthode de DISCHE.
(2) Méthode de BITTER et MUIR.
(3) Manifold 1 : manifold proposé (cf. fig. 1).
(4) Manifold 2 : modification du manifold 1 (cf. II A 2, choix du manifold).

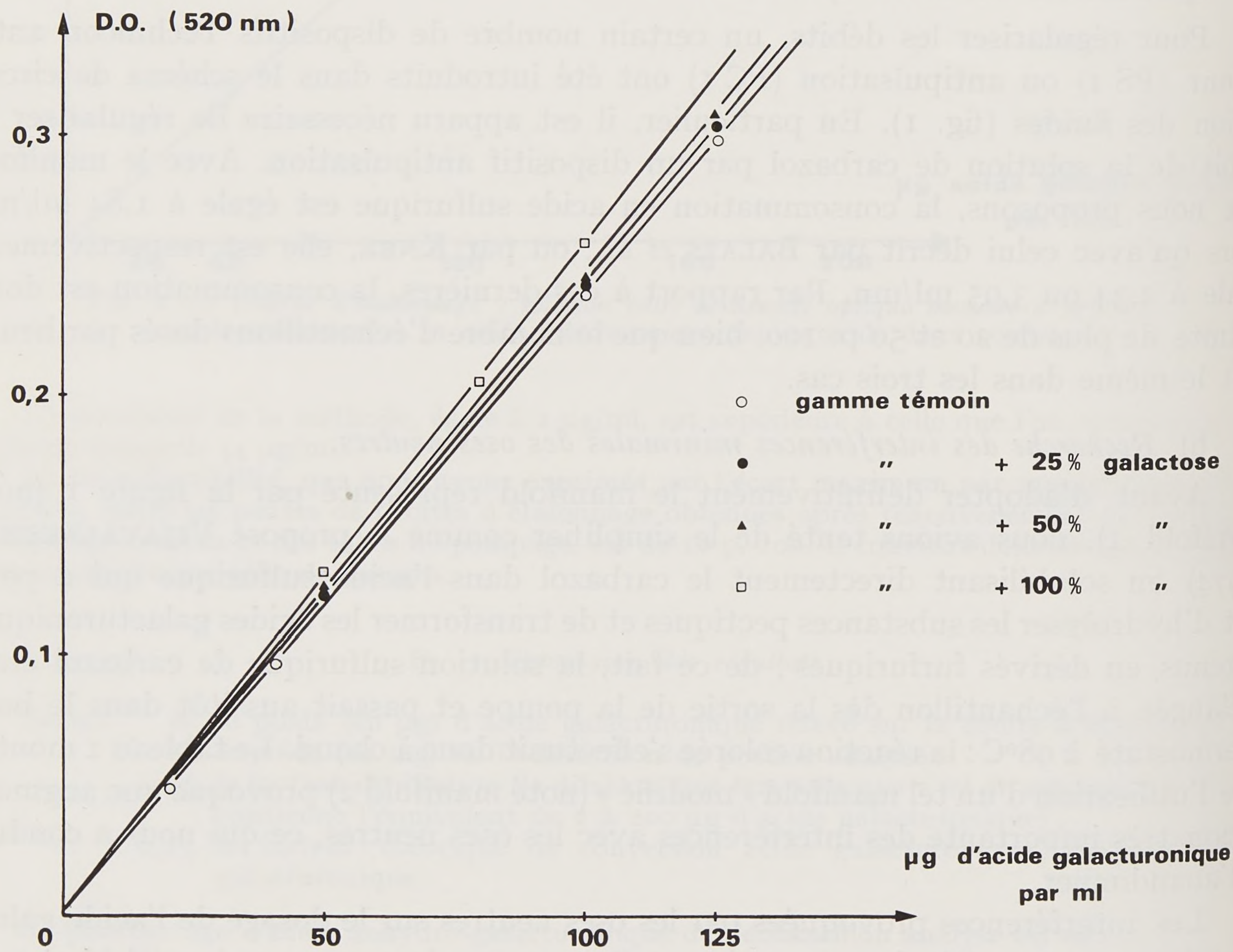



FIG. 3. — *Influence du galactose sur le dosage automatique de l'acide galacturonique par la méthode au carbazol*

SPIK (1963). Par rapport aux résultats de KNEE, nous observons une diminution des interférences, sauf en ce qui concerne le galactose, fait qui reste encore inexpliqué. Ainsi nous pouvons considérer que le xylose, l'arabinose et le rhamnose, oses pouvant entrer dans la composition des pectines, n'interfèrent pas sur le dosage de l'acide galacturonique.

Les interférences du glucose et du galactose ont été examinées de façon plus précise en traçant des courbes d'étalonnage obtenues à partir de solution d'acide galacturonique contenant des concentrations différentes de chacun de ces oses (fig. 3 et 4). Le glucose et le galactose n'interfèrent pas tant que leur concentration reste respectivement inférieure à 5 p. 100 et à 25 p. 100 de la concentration en acide galacturonique. Pour des concentrations en glucose égales à 5 et 50 p. 100 de la concentration en acide galacturonique, l'erreur provoquée est respectivement de 2,4 et 8,6 p. 100, tandis que la présence de galactose introduit une erreur de 2,3 et 3,8 p. 100 quand il représente respectivement 25 et 50 p. 100 de la concentration en acide galacturonique.

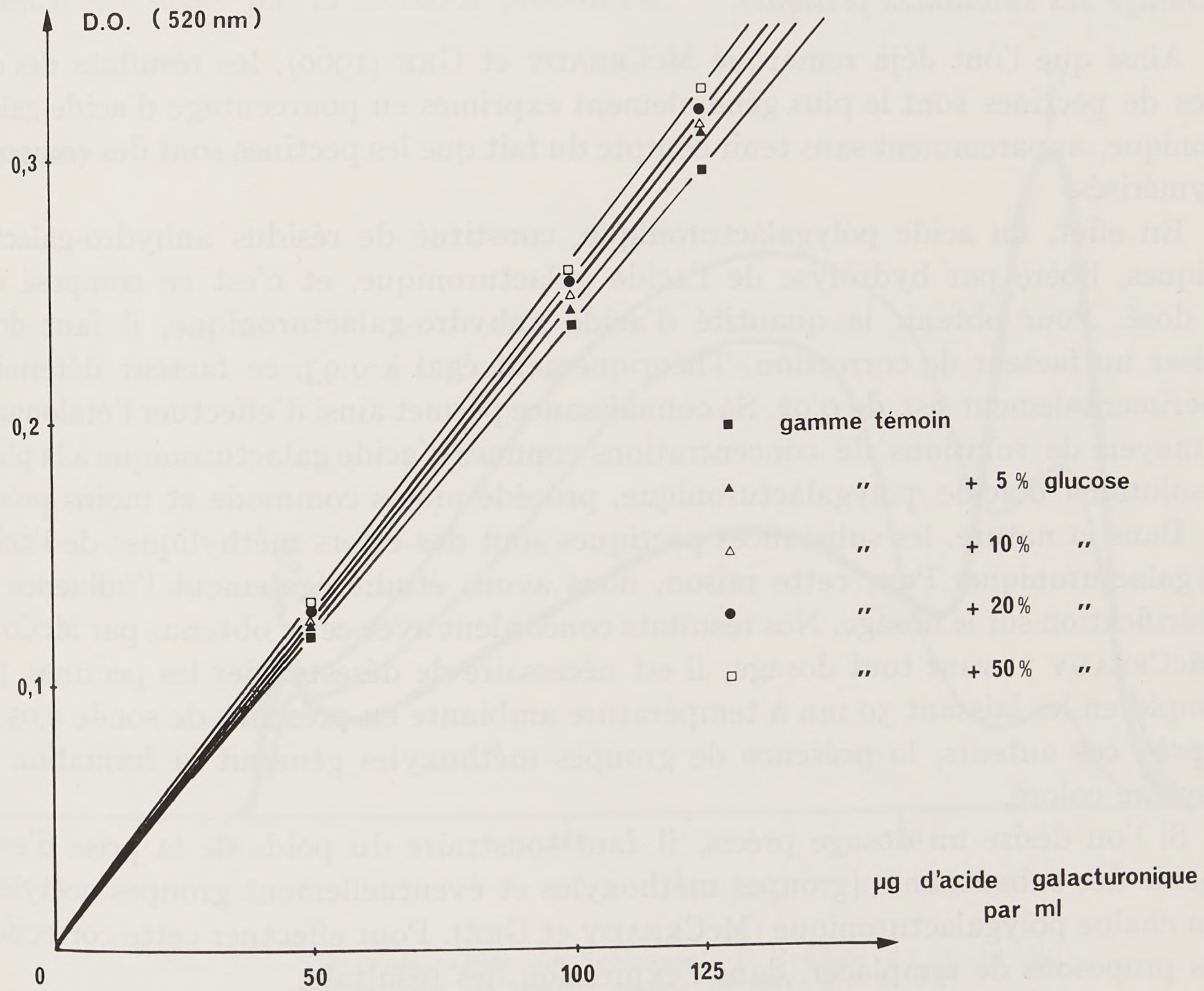



FIG. 4. — *Influence du glucose sur le dosage automatique de l'acide galacturonique par la méthode au carbazol*

### B. — *Étude de l'influence des agents extracteurs des pectines, de protéines et d'antiseptiques sur le dosage de l'acide galacturonique*

Les agents extracteurs de pectines tels que l'oxalate d'ammonium, les sels disodiques ou tétrasodiques de l'acide éthylène-diamine-tétracétique, en concentra-

tion dix fois plus grande que celle de l'acide galacturonique, n'interfèrent pas ; ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par McComb et McCready.

Par contre, nous ne retrouvons pas les résultats de Smit (1971). Cet auteur observe en effet une interférence de l'ordre de 2 p. 100 sur le dosage des pectines par la méthode de Bitter et Muir, des sels disodiques et tétrasodiques de l'acide éthylène-diamine-tétracétique, lorsque ceux-ci sont en concentration cinq fois plus grande que celle de l'acide galacturonique.

L'influence de protéines, telles que la sérum-albumine bovine, a été également étudiée : en concentration dix fois plus grande que celle de l'acide galacturonique, cette protéine n'interfère pas.

Enfin, nous avons examiné l'influence d'antiseptiques usuels : l'azoture de sodium à 0,02 p. 100 inhibe totalement le développement de la coloration tandis que le merthiolate de sodium à 0,005 p. 100 n'a aucune influence sur le dosage.

## C. — *Applications*

1. *Dosage des substances pectiques.*

Ainsi que l'ont déjà remarqué McCready et Gee (1960), les résultats des dosages de pectines sont le plus généralement exprimés en pourcentage d'acide galacturonique, apparemment sans tenir compte du fait que les pectines sont des composés polymérisés.

En effet, un acide polygalacturonique, constitué de résidus anhydro-galacturoniques, libère par hydrolyse de l'acide galacturonique, et c'est ce composé qui est dosé. Pour obtenir la quantité d'acide anhydro-galacturonique, il faut donc utiliser un facteur de correction. Théoriquement égal à 0,93, ce facteur déterminé expérimentalement est de 0,92. Sa connaissance permet ainsi d'effectuer l'étalonnage au moyen de solutions de concentrations connues d'acide galacturonique à la place de solutions d'acide polygalacturonique, procédé moins commode et moins précis.

Dans la nature, les substances pectiques sont des esters méthyliques de l'acide polygalacturonique. Pour cette raison, nous avons étudié également l'influence de l'estérification sur le dosage. Nos résultats concordent avec ceux obtenus par McComb et McCready : avant tout dosage, il est nécessaire de désestérifier les pectines, par exemple en les laissant 30 mn à température ambiante en présence de soude 0,05 N. D'après ces auteurs, la présence de groupes méthoxyles gênerait la formation du complexe coloré.

Si l'on désire un dosage précis, il faut soustraire du poids de la prise d'essai le poids des substituants (groupes méthoxyles et éventuellement groupes acétyles) de la chaîne polygalacturonique (McCready et Gee). Pour effectuer cette correction, nous proposons de remplacer, dans l'expression des résultats,

$$\text{M par M} \left(1 - \frac{\text{MeO. p. 100}}{100} \times \frac{14}{31} - \frac{\text{Ac. p. 100}}{100} \times \frac{42}{43}\right)$$

où MeO p. 100 est la teneur (en poids) de l'échantillon en groupes méthoxyles et Ac. p. 100 la teneur (en poids) en groupes acétyles. Un dosage précis suppose donc la connaissance préalable de ces deux paramètres, de la teneur de l'échantillon en oses neutres, en particulier en glucose et en galactose, et aussi de la teneur éventuelle en autres acides uroniques.

2. *Détection en continu des substances pectiques à la sortie d'une colonne chromatographique.*

La chromatographie par échange d'ions ou par filtration sur gel est un moyen d'analyse commode et rapide, si la détection des substances pectiques à la sortie de la colonne est effectuée automatiquement. Le manifold que nous proposons s'applique aisément à ce type d'analyse : il suffit de relier la sortie de la colonne (prise d'une partie ou de la totalité de l'effluent) au tube de pompage de l'échantillon. Le profil d'élution de l'échantillon est donc enregistré en continu et traduit sa polymolécularité quand il s'agit d'une filtration sur gel et son hétérogénéité de charges quand il s'agit d'une chromatographie d'échange d'ions.

Dans le cas d'un acide pectique, les pics observés sur le profil d'élution peuvent être directement quantifiés. En revanche, il n'en est pas de même pour une pectine : un dosage quantitatif ne peut être réalisé que sur des pectines désestérifiées. Pour pouvoir quantifier les pics obtenus, il faut monter parallèlement à la détection en continu un collecteur de fractions ; chaque fraction devra alors être désestérifiée avant d'être dosée par la méthode précédente.

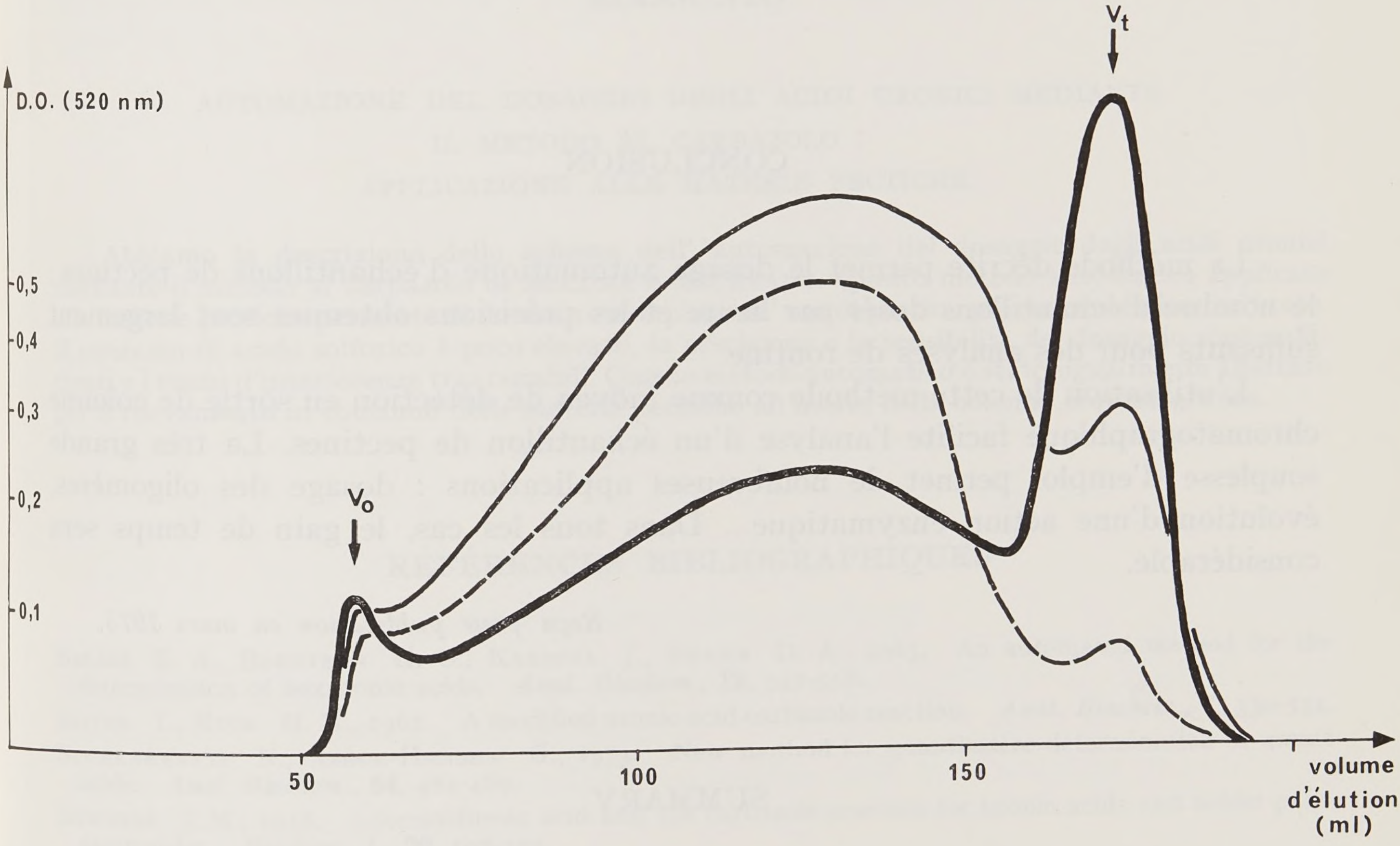



FIG. 5. — *Chromatographie sur Sépharose 2-B* (colonne 2,5 × 40 cm) *équilibré, par un tampon acétate 40 mM, pH = 5,2, d'un échantillon de « genu-pectine »*

▬▬ Détection par méthode automatique à l'orcinol, dépôt de 3 mg.

— — Détection par méthode automatique au carbazol proposée : (manifold 1), dépôt de 2,5 mg.

—— Détection par méthode automatique au carbazol modifiée : (manifold 2), dépôt de 2,5 mg.

Le fractionnement d'un échantillon de pectines sur un tamis moléculaire approprié donne des indications sur sa polymolécularité. La masse moléculaire moyenne « chromatographique » de chaque pic du profil d'élution peut être déterminée après

étalonnage à l'aide de pectines bien fractionnées de masse connue ou d'autres substances étalons ayant le même comportement hydrodynamique que les pectines.

Un exemple de fractionnement d'un échantillon de « genu-pectine » après élution sur Sépharose 2 B est donné par la figure 5. Le profil d'élution obtenu par la méthode que nous proposons (manifold 1) est comparé avec ceux obtenus par notre méthode modifiée (manifold 2) et par le dosage automatique à l'orcinol sulfurique (KESLER, 1967). Les différences entre ces trois profils s'expliquent par la présence dans l'échantillon d'une certaine quantité de polyosides : après hydrolyse acide, la chromatographie sur couche mince montre la présence, en plus de l'acide galacturonique, de glucose, de xylose, d'arabinose, ceux-ci représentant environ 20 p. 100 du poids de l'échantillon. Ces sucres réagissent plus à l'orcinol qu'au carbazol et interfèrent plus sur le dosage des pectines avec le manifold 2 qu'avec le manifold 1.

Cette méthode peut évidemment être aussi adaptée au dosage des oligomères de l'acide galacturonique en choisissant un tamis moléculaire de type Biogel P-2 ou Séphadex G-15 ; les produits terminaux provenant d'une action enzymatique sur une pectine ou sur un acide polygalacturonique peuvent être ainsi détectés.

## CONCLUSION

La méthode décrite permet le dosage automatique d'échantillons de pectines ; le nombre d'échantillons dosés par heure et les précisions obtenues sont largement suffisants pour des analyses de routine.

L'utilisation de cette méthode comme moyen de détection en sortie de colonne chromatographique facilite l'analyse d'un échantillon de pectines. La très grande souplesse d'emploi permet de nombreuses applications : dosage des oligomères, évolution d'une action enzymatique... Dans tous les cas, le gain de temps sera considérable.

*Reçu pour publication en mars 1975.*

## SUMMARY

### AUTOMATION OF URONIC ACID TITRATION BY THE CARBAZOL METHOD : APPLICATION TO THE CASE OF PECTIC SUBSTANCES

The arrangement of MCCOMB and MCCREADY's carbazol method of uronic acid titration automation is described. This automatic method applied to the case of pectic substances permits hourly the titration of 10 previously de-esterified pectin samples. Sulphuric acid consumption is small, titration precision and sensitivity are adequate and interference risks are unimportant. This automatic method has also been adapted for the continuous detection of pectic substances leaving a chromatographic column.

## RESUMEN

### AUTOMATIZACIÓN DE LA DOSIFICACIÓN DE LOS ÁCIDOS URÓNICOS MEDIANTE EL MÉTODO DEL CARBAZOL : APPLICACIÓN AL CASO DE LAS MATERIAS PÉCTICAS

El esquema de la automatización de la dosificación de los ácidos urónicos mediante el método del carbazol de McComb y McCready figura descrito en el artículo. Este método automático, aplicado al caso de las materias pécticas, permite la dosificación de 10 muestras de pectinas, previamente desesterificadas, por hora. El consumo en ácido sulfúrico es de poca cuantía, y la precisión y la sensibilidad de la dosificación son suficientes y los riesgos de interferencias poco importantes. Este método automático ha sido adaptado también para la detección continua de las materias pécticas a su salida de la columna cromatográfica.

## RIASSUNTO

### AUTOMAZIONE DEL DOSAGGIO DEGLI ACIDI URONICI MEDIANTE IL METODO AL CARBAZOLO : APPLICAZIONE ALLE MATERIE PECTICHE

Abbiamo la descrizione dello schema dell' automazione del dosaggio degli acidi uronici mediante il metodo al carbazolo di McComb e McCready. Questo metodo automatico applicato alle materie pectiche permette di dosare 10 campioni all' ora di pectine previamente disesterificate. Il consumo di acido solforico è poco elevato, la precisione e la sensibilità del dosaggio sono sufficienti e i rischi d'interferenze tras curabili. Questo metodo automatico è stato ugualmente adattato per il rilevamento in continuo delle materie pectiche all'uscita della colonna cromatografica.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Balazs E. A., Berntsen K. O., Karossa J., Swann D. A., 1965. An automated method for the determination of hexuronic acids. *Anal. Biochem.*, **12**, 547-558.

Bitter T., Muir H. M., 1962. A modified uronic acid carbazole reaction. *Anal. Biochem.*, **4**, 330-334.

Blumenkrantz N., Asboe-Hansen G., 1973. New method for quantitative determination of uronic acids. *Anal. Biochem.*, **54**, 484-489.

Bowness J. M., 1958. 5-formylfuroïc acid and the carbazole reaction for uronic acids and acidic polysaccharides. *Biochem. J.*, **70**, 107-110.

Dische Z., 1947. A new specific color reaction of hexuronic acids. *J. Biol. Chem.*, **167**, 189-198.

Helbert J. R., Brown K. D., 1959. Influence of amino acids upon the anthrone reaction of uronic acids. *Anal. Chem.*, **31**, 1700-1702.

Johnson S., Samuelson O., 1966. Automated chromatography of uronic acids on anion-exchange resins. *Anal. Chim. Acta.*, **36**, 1-11.

Kesler R. B., 1967. Rapid quantitative anion-exchange chromatography of carbohydrates. *Anal. Chem.*, **39**, 1416-1422.

Khym J. X., Doherty D. G., 1952. The analysis and separation of glucuronic and galacturonic acids by ion exchange. *J. Amer. Chem. Soc.*, **74**, 3199-3200.

Knee M., 1973. Polysaccharides and glycoproteins of apple fruit cell walls. *Phytochemistry*, **12**, 637-653.

McComb E. A., McCready R. M., 1952. Colorimetric determination of pectic substances. *Anal. Chem.*, **24**, 1630-1632.

McCready R. M., Gee M., 1960. Determination of pectic substances by paper chromatography. *Agr. Food Chem.*, **8**, 510-513.

Montreuil J., Spik G., 1963. Microdosage des glucides. Fascicule 1. Méthodes colorimétriques de dosage des glucides totaux. 60-70.

Rahman M. B., Joslyn M. A., 1953. The hydrolysis of pectic acid by purified fungal polygalacturonase. *Food Res.*, **18**, 308-318.

Smit C. J. B., 1971. Influence of extracting agents during the colorimetric determination of pectic substances. *J. Food Sci.*, **36**, 964-965.

Stacey M., Somers P. J., 1969. Technique aspects of carbohydrates. *Lab. Prac.*, **18**, 1172-1180.

Vijayalakshmi M. A., 1974. *Composition des pectines des jus de pommes obtenus à partir de fruits frais et de fruits congelés.* Thèse de doctorat en Biologie appliquée. Université de Dijon.

Wardi A. H., Allen W. S., Varma R., 1974. A simple method for the detection and quantitative determination of hexuronic acids and pentoses. *Anal. Biochem.*, **57**, 268-273.

---

*Ann. Technol. agric.*, 1975, **24** (1), 111-114.

INFORMATIONS

# INSTITUT PASTEUR, PARIS
# ENSEIGNEMENTS 1975-1976

Ces enseignements sont du niveau post-universitaire. Ils sont destinés aux diplômés des Facultés des Sciences, de Médecine, de Pharmacie et aux anciens élèves des grandes Écoles. Toutefois, des étudiants en fin de scolarité pourraient être également admis dans la mesure des places disponibles.

## I. — ENSEIGNEMENTS GÉNÉRAUX

### COURS DE MICROBIOLOGIE SYSTÉMATIQUE

Généralités — Techniques bactériologiques — Étude des divers groupes de bactéries d'intérêt médical.

Généralités — Techniques virologiques — Étude des divers groupes de virus d'intérêt médical.

Plein temps, sauf le samedi après-midi, de fin septembre à début mars.

### COURS D'IMMUNOLOGIE GÉNÉRALE

Enseignement intégré théorique et pratique d'immunologie moléculaire et cellulaire, faisant une large place à l'acquisition des méthodes.

*Antigènes :* Spécificité — Réactions antigènes-anticorps et bases de l'immunochimie quantitative — Immunogénicité.

*Immunoglobulines :* Structure — Déterminisme génétique.

*Réponse immunitaire :* Cellules impliquées dans la réponse humorale — Réponse à médiation cellulaire.

Plein temps, sauf le samedi, de mars à début juin.

### COURS DE MICROBIOLOGIE GÉNÉRALE

Première partie (22 septembre-fin décembre) : Anatomie fonctionnelle des bactéries — Physiologie microbienne — Fonction du gène et mutations — Échanges génétiques — Bactériophages.

Deuxième partie (début janvier-début mars) : Structure et physiologie des cellules eucaryotes — Anatomie structurale et biochimique des virus — Réplication des virus à ARN et à ADN — Génétique des virus — Virus oncogènes.

Plein temps sauf le samedi. Les candidats peuvent demander l'inscription soit à l'une, soit à l'autre, soit aux deux parties.

### COURS D'IMMUNOLOGIE APPROFONDIE

Enseignement apportant l'ensemble des données fondamentales du programme du cours d'Immunologie Générale. La participation active des élèves se concrétisera par la présentation de séminaires, par la préparation, la réalisation et la discussion de travaux pratiques. Une large part sera faite aux aspects génétiques, moléculaires et cellulaires de la réponse immunitaire.

Plein temps, sauf le samedi, de mars à fin juin.

## II. — ENSEIGNEMENT SPÉCIALISÉES

### COURS DE MICROBIOLOGIE DU SOL

Bactéries responsables des cycles biologiques du carbone, de l'azote et des principaux éléments minéraux — Population du sol — Interactions des micro-organismes entre eux et avec les plantes — Facteurs édaphiques et climatiques — Humus et humification.

Plein temps, septembre : 3 semaines. Enseignement dispensé à l'Institut National Agronomique avec la collaboration de la Chaire de Microbiologie de cet organisme.

### COURS DE MYCOLOGIE MÉDICALE

Champignons pathogènes pour l'homme et les animaux : Morphologie, Physiologie, Biochimie, Écologie, Mycoses : Clinique, Diagnostic biologique, Histopathologie, Immunologie, Antifongique.

Tous les après-midi, sauf le samedi et le matin deux fois par semaine (fin septembre à fin octobre).

### COURS D'INITIATION A LA RECHERCHE EN ÉPIDÉMIOLOGIE DES MALADIES TRANSMISSIBLES

Disciplines biologiques — Disciplines écologiques — Disciplines expérimentales — Disciplines mathématiques : statistique, informatique, biomathématique.

Tous les après-midi, sauf le samedi. Durée 3 mois. Cet enseignement n'est plus dispensé qu'un an sur deux. Prochain cours durant l'année universitaire 1976-1977. Dates précisées ultérieurement.

### COURS SUR LA PHYSIOLOGIE, LA GÉNÉTIQUE, L'ÉCOLOGIE DE LA RÉSISTANCE AUX AGENTS ANTI-MICROBIENS
(A. E. A. de l'Université René-Descartes, Paris, U. E. R. Necker, Enfants Malades)

Biochimie et Génétique de la résistance microbienne — Rôle des plasmides de résistance dans l'écologie microbienne.

Tous les après-midi, sauf le samedi, du 10 au 29 novembre 1975-Séminaires hebdomadaires. Ce cours est dispensé une année sur deux.

### COURS D'IMMUNOLOGIE DES INFECTIONS BACTÉRIENNES ET VIRALES

Phénomènes immunitaires dans les infections bactériennes et virales — Modèles d'applications au diagnostic — Pathologie de l'immunité anti-infectieuse.

Plein temps, sauf le samedi, de mi-juin à mi-juillet.

### COURS D'IMMUNO-HÉMATOLOGIE ET D'IMMUNO-PATHOLOGIE MÉDICALES

Immuno-hématologie (érythrocytaire, leucocytaire et sérique) — Immuno-pathologie des affections thyroïdiennes, gastriques, musculaires, rénales, hépatiques et des collagénoses.

Plein temps, sauf le samedi après-midi (juillet : 4 semaines).

## III — ENSEIGNEMENTS MÉTHODOLOGIQUES

### COURS DE CULTURES CELLULAIRES APPLIQUÉES A LA VIROLOGIE

Méthodes de cultures cellulaires appliquées à l'étude des virus — Différents types de cultures cellulaires (cellules primaires, de lignée continue, etc.) — Isolement des virus — Différentes méthodes d'identification — Titrage des virus — Principales applications pratiques de ces méthodes.

Plein temps, sauf le samedi après-midi (novembre : 2 semaines).
Nombre d'élèves : 20.

### COURS DE MICROSCOPIE ÉLECTRONIQUE

Aspects physiques de la formation de l'image — Dispositifs — Méthodes de préparation des objets — Photomicrographie — Autoradiographie — Mesures — (Options : cryodécapage, microscopie électronique à balayage).

Plein temps, sauf le samedi (mars : 2 semaines).

Nombre d'élèves : 8.

### COURS SUR L'IMMUNOFLUORESCENCE ET LES RÉACTIONS IMMUNOENZYMATIQUES

Session : Application aux recherches en Biologie et en Pathologie.

Plein temps (mai : 6 journées).

Nombre d'élèves : 16.

Session : Purification et marquage des anticorps, pratique des réactions.

Plein temps (mai : 9 journées).

Nombre d'élèves : 16.

Le nombre de places étant limité, il convient de déposer les candidatures plusieurs mois à l'avance. Les dates de ces cours sont susceptibles de modifications d'une année à l'autre. Les candidats retenus en seront informés en temps voulu.

Les demandes de renseignements et les candidatures doivent être adressés au :

Secrétariat Général des Enseignements
Institut Pasteur — 28, rue du Docteur-Roux,
75015 Paris

*Ann. Technol. agric.*, 1975, **24** (1), 115.

# CHRONIQUE DES LIVRES

RÉFRIGÉRATION ET MATURATION DES FRUITS : RELATION AVEC LA QUALITÉ. — Bulletin de l'Institut International du Froid, annexe 1973-3, 255 p. Paris.

Ce livre traite des travaux de la Commission C2 (Sciences et Technologie Alimentaires) qui s'est réunie à Jérusalem (Israël) du 10 au 13 septembre 1973.

27 communications ont été présentées par les meilleurs experts en matière de physiologie végétale. Ces rapports proviennent de 8 pays (Australie, Espagne, France, Israël, Norvège, Pays-Bas, Roumanie, U. S. A.). 15 rapports sont rédigés en français, 12 en anglais. Chaque mémoire, reproduit in-extenso, est accompagné d'un résumé dans l'autre langue et des discussions auxquelles il a donné lieu.

Le thème général de l'ouvrage se rapporte à la réfrigération et à la maturation des fruits, en relation avec leur qualité. Les mémoires traitent des sujets suivants : réglage de la maturation du point de vue physiologique et pratique, nouvelles méthodes d'entreposage en atmosphère contrôlée et quelques résultats d'utilisation, influence des traitements avant entreposage et du conditionnement sur la qualité.

*Analyse de l'éditeur.*

LYOPHILISATION DE MATIÈRES BIOLOGIQUES. — Bulletin de l'Institut International du Froid, annexe 1973-5, 121 p. Paris.

Ce livre traite des travaux de la Commission C1 (lyophilisation ; cryobiologie ; applications médicales) qui s'est réunie à Sapporo (Japon) du 7 au 10 octobre 1973.

13 mémoires ont été présentés par d'excellents experts en matière de lyophilisation. Ces communications ont été présentées par des auteurs de 3 pays (États-Unis, Japon, Royaume-Uni). Tous ces rapports sont écrits en anglais, mais chacun d'eux est accompagné d'un résumé informatif en français et des discussions auxquelles il a donné lieu.

Le thème général de l'ouvrage se rapporte à la lyophilisation des matières biologiques et traite notamment des aspects suivants :

- dénaturation biochimique provoquée par la congélation et la dessiccation des systèmes biologiques ;
- moyens de protection et additifs utilisables dans les milieux de congélation ;
- effet de la lyophilisation sur la viabilité, le comportement physiologique et les modifications des caractères génétiques des organismes vivants.

Cette brochure apportera des éléments d'information du plus haut intérêt aux spécialistes de la lyophilisation des matières biologiques.

*Analyse de l'éditeur.*

# RECOMMANDATIONS AUX AUTEURS

Le manuscrit doit être dactylographié sur papier format 21 × 29,7, avec un double interligne, au recto seulement. Chaque page sera numérotée et des feuilles *séparées* seront utilisées pour les références bibliographiques, les tableaux, les légendes des figures et graphiques, etc.

*Au début de chaque mémoire*, on indiquera : — *le titre du mémoire :* il ne devra pas comporter d'abréviations ni de formules chimiques (sauf pour les isotopes) ; — *le nom des auteurs*, précédé des initiales du prénom pour les hommes, du prénom complet pour les femmes ; — *le nom des techniciens* ayant collaboré à l'étude relatée, précédé de la mention : avec la collaboration technique de... ; — *le nom de l'établissement*, dans lequel ont été effectuées les recherches et son adresse.

*Les mémoires* seront rédigés, autant que possible, d'après le plan ci-dessous :
a) *résumé* (250 mots max.) suffisamment précis pour que sa lecture renseigne sur la nature du travail et son importance ; b) *introduction* dans laquelle on indique l'objet des recherches entreprises en relation avec les travaux déjà effectués dans le domaine ; c) *techniques expérimentales et matériel utilisé*, en donnant, sous une forme concise, tous les détails nécessaires pour que le lecteur puisse répéter les expériences ; d) *résultats*, à présenter de la manière la plus brève possible ; e) *discussion et conclusions ;* f) *titre et résumé* en anglais ou destinés à être traduit en anglais comportant une analyse *complète* de l'article ; g) *remerciements* pour les collaborations, les fonds, les dons... ; h) *références bibliographiques.*

*Les travaux originaux en anglais* doivent présenter la même composition que les mémoires rédigés en français, mais ils comportent obligatoirement un résumé français *très complet.* Les figures, graphiques tableaux et photographies seront sous-titrés en français.

*Pour les autres documents* (notes, mises au point, revues, rapports, etc.) l'auteur devra suivre un plan logique et le mettre en évidence par une titration appropriée.

*Les références bibliographiques* doivent être citées dans le texte de la manière suivante : (DUPONT et DUVAL, 1954). Lorsque la référence comporte plus de trois auteurs, seul le premier auteur sera mentionné suivi de *et al.* A la fin de l'article, les références constituant la bibliographie doivent être citées par ordre alphabétique des noms d'auteurs, et par ordre de dates pour un même auteur.

*Pour les articles :* le (s) nom (s) de (s) auteur (s) suivi (s) des initiales du (des) prénom (s) ; la date de parution de l'article ; le titre de l'article (dans la langue originale pour l'allemand, l'anglais, l'italien, l'espagnol et en français dans tous les autres cas, avec indication entre parenthèses de la langue d'origine, sauf si l'auteur étranger a sous-titré dans l'une des quatre langues mentionnées) ; le titre du périodique en abrégé, selon la *World List of Scientific Periodicals*, ou le *Bulletin Signalétique du C. N. R. S.* ; le volume ; la première et la dernière page de l'article.

*Pour les ouvrages :* le nom de l'auteur avec les initiales du prénom ; la date de l'édition ; le titre complet de l'ouvrage dans la langue originale, sans abréviations (pour les langues utilisant des alphabets autres que l'alphabet latin, la traduction du titre sera donnée entre parenthèses, avec mention de la langue d'origine) ; le volume ; la première et la dernière page du paragraphe se rapportant aux résultats discutés et, si l'on cite l'ouvrage en entier, le nombre de volumes et le nombre total de pages ; le numéro de l'édition s'il y en a plusieurs ; le nom de l'éditeur ; le lieu de l'édition. Si l'ouvrage est collectif, on indiquera en plus le nom de l'auteur du chapitre cité, le nom des rédacteurs principaux, précédé de la mention « in », le titre de l'ouvrage.

La mention de « communications personnelles » ou « données non publiées » etc. doit être faite entre parenthèses. Lorsque l'auteur a relevé une référence dans une revue d'« Abstracts », le mentionner à la fin de la référence, entre parenthèses.

*Les tableaux, dessins, graphiques, cartes, photographies, doivent être fournis à part.* Les tableaux et figures doivent faire l'objet de deux numérotations distinctes, en chiffres arabes l'une et l'autre.

Les auteurs peuvent disposer leurs tableaux soit dans le sens de la largeur de la revue, soit dans le sens de la longueur. Dans le sens de la largeur, le total des signes et des espaces disponibles est de 100. Dans le sens de la longueur, il est de 155. Les tableaux en longueur, c'est-à-dire ceux pouvant disposer de 155 signes, ne seront admis que s'ils comprennent plus de 8 lignes de chiffres, de manière qu'une page entière de la revue ne soit pas occupée par un tableau très long et très étroit. Les graphiques ne doivent pas faire double emploi avec les tableaux.

Les légendes et les énoncés des graphiques et dessins doivent être dactylographiés sur une même feuille séparée et porter les numéros des figures.

*Les graphiques, schémas, cartes, dessins d'appareils* seront envoyés soit *à l'état définitif* soit *à l'état de projets*, leur exécution définitive étant confiée au Bureau de Dessin de l'I. N. R. A. Seules deux réductions à l'impression sont admises : *soit* × 0,5, *soit* × 0,25.

Il est rappelé que le format utile des *Annales* est : 12,5 × 19,5 cm ; ces dimensions ne doivent pas être dépassées.

*Photographies :* Il est recommandé de fournir des épreuves bien contrastées sur papier blanc, et de préférence en format 9 × 12. Si les photographies doivent être associées pour constituer des planches, on adoptera les normes suivantes : 2 photos : 9 × 12 ; 4 photos : 9 × 5,5 ; 6 photos : 5, 5 × 5,5. Dans ce cas, chaque photo devra porter un numéro en chiffres arabes visible après clichage.

Les légendes des photographies doivent être dactylographiées sur une même feuille séparée et porter les numéros des figures.

Il est demandé d'indiquer sur le manuscrit, dans la marge, en regard du texte, l'emplacement souhaité des tableaux et figures.

*Envoi du manuscrit :* M^me COLLON, Station d'Œnologie et de Technologie végétale, 11104 Narbonne, ou M. DUPUY, Chef du Département de Technologie des Produits végétaux, Centre de Recherches de Dijon, 21034 Dijon Cedex. On demande deux exemplaires.

*Correction des épreuves :* les épreuves que les auteurs recevront à corriger sont à retourner, après correction, à M^me COLLON.

*Le Directeur de la publication:* M.-L. Cagnac

---

Imprimerie Bussière à Saint-Amand (Cher), France. — 9-1975

---

*Dépôt légal: 3e trimestre 1975. N° d'impression : 1062.*

# annales de technologie agricole

Trimestriel

1975

Vol. 24 . N° 2

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

Reproduction, même partielle, interdite sans autorisation des auteurs
et de l'Institut national de la Recherche agronomique
à l'exception des résumés

*Ann. Technol. agric.*, 1975, **24** (2), 117-131.

# MÉTHODE RAPIDE DE DÉTERMINATION QUANTITATIVE DES LIPIDES TOTAUX DANS LES PRODUITS CÉRÉALIERS

R. DRAPRON

avec la collaboration technique de J. OUDOT

*Station de Biochimie et Physico-Chimie des Céréales, I. N. R. A., C. E. R. D. I. A., 91305 Massy*

## RÉSUMÉ

La méthode proposée permet de déterminer la teneur en lipides totaux des denrées à base de céréales. Son principe est fondé sur l'hydrolyse ménagée des produits au moyen d'acide chlorhydrique, en présence d'acide formique et d'éthanol. Les complexes lipoprotéiques et glucidiques sont dissociés, du formiate d'éthyle, solvant des lipides, est formé *in situ* sous l'action catalytique des ions $H^+$. Après extraction liquide-liquide au moyen d'hexane, suivie d'une élimination des solvants par évaporation, les lipides sont dosés par gravimétrie.

Elle présente l'intérêt de doser la totalité des lipides, en particulier dans les produits ayant subi un traitement thermique.

L'utilisation d'un appareillage très simple permet de réduire au maximum les pertes par transvasement.

D'exécution facile et rapide (2 h), cette méthode conduit à des résultats présentant une excellente répétabilité et se prête facilement à des déterminations en petites séries.

Mots clés : *produits céréaliers, lipides, dosages.*

## INTRODUCTION

Les lipides jouent un rôle important dans la technologie des produits céréaliers, que ce soit lors de leur fabrication en intervenant, par exemple, sur les caractéristiques rhéologiques des pâtes de farine de blé et par conséquent sur la qualité des produits finis, ou au cours du stockage en raison des altérations consécutives à leur oxydation ou à leur hydrolyse.

Les lipides interviennent également de façon non négligeable sur la valeur alimentaire et commerciale des denrées à base de céréales.

C'est pourquoi l'Association de Chimie céréalière (I. C. C.) a créé un groupe de travail chargé d'étudier les problèmes posés, et en tout premier lieu de mettre au

point et de standardiser une méthode rapide, sûre et sensible, de dosage des lipides totaux dans les produits céréaliers.

La teneur en lipides des céréales est généralement faible, sauf dans le cas de l'avoine et de certaines variétés de maïs. Les lipides sont concentrés dans l'embryon et les enveloppes du grain en sont relativement riches. Une partie se trouve à l'état libre, extractible par les solvants apolaires, une autre à l'état lié aux polyosides et aux protéines tout spécialement, plus ou moins facilement extractible au moyen de mélanges de solvants polaires et apolaires. De plus, les traitements thermiques des céréales, la cuisson en particulier, provoquent une nouvelle association d'une fraction des lipides libres avec les autres constituants, par des liaisons suffisamment fortes pour qu'un solvant polaire soit incapable de les rompre, ce qui rend pratiquement impossible la détermination de la quantité initialement présente.

Le but essentiel du dosage est donc de déterminer aussi bien les lipides préexistants dans les céréales et les produits qui en dérivent que les matières grasses qui ont pu être ajoutées au cours des différents traitements technologiques.

Ainsi, il importe de disposer d'une méthode faisant intervenir, tout à la fois, des réactifs capables de dissocier les complexes lipoprotéiques et glucidiques et des solvants spécifiques des lipides. En outre, la méthode implique un traitement des produits minimisant les décompositions oxydatives — auxquelles les lipides de la plupart des céréales sont particulièrement sensibles, du fait de leur teneur en acides polyinsaturés qui atteint 60 p. 100 des acides gras totaux pour une farine de blé par exemple — et hydrolytiques, conduisant à des artefacts et conséquemment à des erreurs de dosage par excès ou par défaut.

A cette fin, de très nombreuses méthodes ont été proposées parmi lesquelles on peut citer :

— l'extraction classique au moyen d'appareils de Soxhlet ou de Kumagawa, par des mélanges de solvants polaires et apolaires : éthanol-hexane ou éthanol-éther diéthylique, par exemple,

— l'extraction par le butanol saturé d'eau (MECHAM et MOHAMAD, 1955),

— l'extraction par le mélange méthanol-chroroforme-eau (TSEN, LEVI et HLYNKA, 1962),

— l'extraction azéotropique eau-alcool-benzène (RECH, 1968).

Cependant, toutes présentent des inconvénients : l'extraction est souvent incomplète en raison, d'une part, de la présence de lipides fortement liés aux autres constituants, d'autre part, des difficultés de diffusion des solvants au sein de particules de taille et de compacité plus ou moins grandes ; de plus, il est indispensable, dans la plupart des cas, de soumettre les extraits obtenus à de nouveaux traitements, afin d'éliminer les glucides et protides entraînés par les solvants polaires ; enfin, toutes ces techniques sont longues et les nombreux transvasements qu'elles nécessitent conduisent à des pertes en lipides qu'il est pratiquement impossible d'éviter.

En vue de doser la totalité des lipides libres et liés, plusieurs méthodes faisant intervenir une hydrolyse acide des produits, suivie d'une extraction par un solvant, ont été décrites. C'est ainsi que l'Association américaine des Chimistes officiels de l'Agriculture (A. O. A. C., 1960), l'Association des Chimistes céréaliers américains (A. A. C. C., 1962) ont codifié une méthode fondée sur ce principe. Une variante de celle-ci a été proposée dans le cadre international de l'I. C. C. (ZIEGLER, 1964, 1968).

En France, une étude critique des techniques de dosage dans les produits céréaliers a été réalisée au sein du C. N. E. R. N. A. et des conditions particulières d'hydrolyse acide et d'extraction ont été proposées pour servir de base à une méthode de référence (C. N. E. R. N. A., 1958).

Ces méthodes restent encore relativement longues et laborieuses et, bien qu'il soit parfois possible de faire des bilans exacts dans certains produits élaborés, les lipides sont souvent obtenus dans un état de dégradation tel qu'il est impossible de faire une estimation précise de la quantité réellement présente initialement.

Ainsi, aucune des techniques décrites jusqu'à présent ne répond aux critères exigés pour l'estimation précise et rapide des lipides totaux dans les produits céréaliers, en particulier dans ceux ayant subi un traitement de cuisson. C'est pourquoi nous avons été conduits, après de nombreux essais, à mettre au point une nouvelle méthode répondant à ces exigences.

## MÉTHODES EXAMINÉES

— Méthode d'extractions successives à l'hexane et à l'éther diéthylique pendant 15 heures chacune, à l'aide de l'appareil de Soxhlet. Les solvants sont éliminés par distillation suivie d'une évaporation sous courant d'azote. Cette méthode permet d'extraire uniquement les lipides libres.

— Méthode d'extraction à l'azéotrope hexane-éthanol (75 ml d'hexane + 25 ml éthanol à 95 p. 100) pendant 15 heures au moyen de l'appareil de Kumagawa (inspirée des méthodes de Hadorn et Jungkunz, 1952 et de Rech, 1968). L'extrait, après élimination des solvants, est repris par l'hexane et filtré sur verre fritté n° 4 (tube d'Allihn) contenant une petite quantité de sulfate de sodium anhydre. L'extrait obtenu après élimination de l'hexane est éventuellement purifié par lavage suivant la méthode de Folch *et al.* (1957). Les solvants sont éliminés par distillation suivie d'une évaporation sous courant d'azote.

— Méthode d'hydrolyse acide à l'ébullition (Ziegler, 1964, 1968). Le produit est traité par l'acide chlorhydrique 4N à l'ébullition pendant 20 minutes ; le mélange est filtré sur filtre en papier et le résidu insoluble lavé par l'eau bouillante jusqu'à élimination des ions $H^+$. Le filtre et son contenu sont déshydratés à 105°C pendant 2 h puis extraits au Soxhlet pendant 3 heures par de l'hexane. Après évaporation du solvant par distillation, les lipides sont portés, tels quels ou en présence de BHT, à l'étuve à 105°C pendant 1 heure ou placés pendant 10 mn sous courant d'azote à température ordinaire, afin d'éliminer les traces de solvant et d'eau.

## MÉTHODE PROPOSÉE

### *Définition*

On entend par lipides totaux la quantité totale de substances solubles dans l'hexane obtenue après hydrolyse acide partielle du produit.

### *Principe*

La méthode est fondée sur l'hydrolyse ménagée du produit au moyen d'acide chlorhydrique, en présence d'acide formique et d'éthanol. Les complexes lipoprotéiques et glucidiques sont dissociés, du formiate d'éthyle, solvant des lipides, est formé *in situ* sous l'action catalytique des ions $H^+$. Après extraction liquide-liquide au moyen d'hexane, suivie d'une élimination des solvants par évaporation, les lipides sont dosés par gravimétrie.

*Domaine d'application*

La méthode est applicable à tous les produits céréaliers et aliments pour le bétail à base de céréales. Son extension à d'autres produits est envisagée.

*Description*

1. *Réactifs.*

1. 1. Éthanol à 95 p. 100 ; $d = 0{,}810$ (25°C).
1. 2. Solution d'acide chlorhydrique, $d = 1{,}12$, 25°C.
[HCl, $d = 1{,}19$ (4°C) + $H_2O$ (50 — 20 V/V)]
1. 3. Acide formique à 99 p. 100.
1. 4. Hexane *n*, p.e. 68-70°C (résidu d'évaporation de 100 cm³ inférieur à 0,001 g).

2. *Appareillage.*

2. 1. Balance analytique, précision de 0,1 mg, portée de 200 g.
2. 2. Broyeur (1).
2. 3. Tamis à mailles de 0,400 mm.
2. 4. Bain thermostaté à 75°C ± 1°.
2. 5. Flacon d'hydrolyse et d'extraction, décrit dans la figure 1, sur lequel peut s'adapter un condensateur à reflux.
2. 6. Ballon à fond rond de 250 ml, à col rodé.
2. 7. Appareil de distillation chauffé électriquement (évaporateur rotatif sous vide de préférence).
2. 8. Agitateur magnétique avec barreau aimanté enrobé de teflon (∅ = 0,6 cm ; l = 2,5 cm).
2. 9. Azote comprimé.

3. *Préparation de l'échantillon.*

3. 1. Dimension des particules : elle devra être telle que moins de 5 p. 100 du produit reste sur le tamis à mailles de 0,400 mm.
3. 2. Échantillonnage : suivant la norme AFNOR, NF. V. 03700.
3. 3. Détermination de la teneur en eau : suivant la norme AFNOR, NF. V. 03701 soit, pour les produits céréaliers, 130°C pendant 2 h.

4. *Mode opératoire.*

4. 1. Tarer le ballon à fond rond.
4. 2. Hydrolyse : introduire 8 g d'échantillon dans le flacon d'hydrolyse et d'extraction contenant le barreau aimanté ; répartir le produit sur le fond du flacon.

Ajouter 8 ml d'éthanol et placer le flacon sur l'agitateur magnétique pendant quelques instants de manière à obtenir une pâte aussi homogène que possible.

Ajouter 8 ml d'acide formique et 12 ml d'acide chlorhydrique. Homogénéiser le mélange au moyen de l'agitateur magnétique après addition de chacun des réactifs.

Placer le flacon, muni du condenseur à reflux, dans le bain thermostaté, pendant 15 mn, en agitant manuellement le mélange de temps à autre.

Retirer le condenseur, refroidir le flacon sous courant d'eau et le placer sur l'agitateur magnétique.

4. 3. Extraction des lipides : introduire successivement 20 ml d'éthanol puis 50 ml d'hexane. Agiter le mélange pendant 5 mn, en réglant la rotation du barreau aimanté à une vitesse permettant d'obtenir une émulsion complète des deux phases et évitant toutefois la projection de liquide à l'extérieur.

Laisser décanter, puis transvaser l'hexane dans le ballon à fond rond, la phase aqueuse restant dans le tube latéral du flacon extracteur.

Rincer le col de ce dernier avec quelques gouttes d'hexane. Introduire de nouveau 30 ml d'hexane, agiter le mélange pendant 5 mn et récupérer la phase hexane dans le ballon, puis répéter encore 2 fois l'extraction.

(1) Nous avons utilisé un broyeur étanche à lames rotatives IKA-A-10S (commercialisé par Labo Moderne), muni d'une jaquette de refroidissement, permettant d'éviter un échauffement important et la perte d'eau au cours de l'opération.

Éliminer l'hexane par distillation sous pression réduite, en utilisant de préférence un évaporateur rotatif.

Immédiatement après, faire passer un courant d'azote dans le ballon, pendant 10 mn. Peser le ballon et déterminer la quantité de lipides extraits.

5. *Expression des résultats.*

Soient :

*m*, la masse, en grammes, des lipides extraits,
M, la masse, en grammes, de la prise d'essai,
L, la teneur en lipides, p. 100 du produit tel quel,
U, l'humidité du produit, en p. 100.

La teneur en lipides totaux, en p. 100 en masse du produit tel quel (L), est égale à $m \times \frac{100}{M}$ ;

lorsqu'elle est rapportée à la substance sèche, elle est calculée suivant la formule : $L \times \frac{100}{100 - U}$.

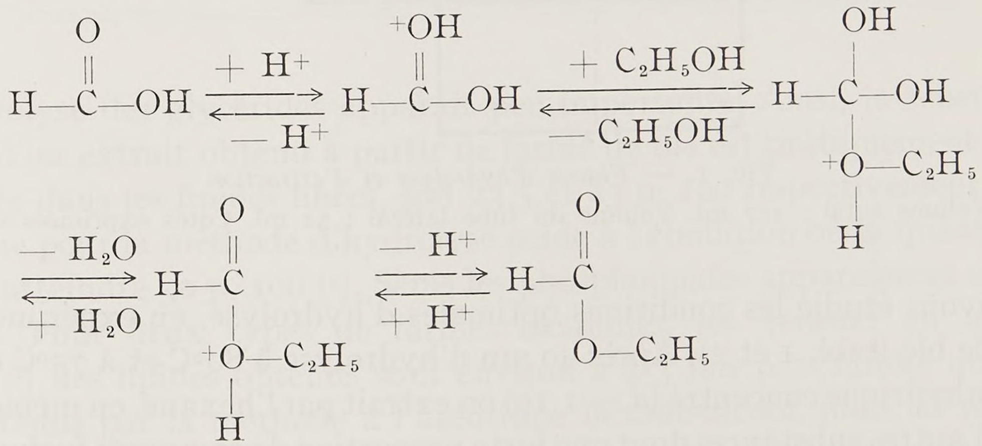
## JUSTIFICATION DES CONDITIONS OPÉRATOIRES

### *Conditions d'hydrolyse*

Au début de nos recherches, nous nous sommes inspirés des conditions opératoires décrites dans la méthode proposée par le C. N. E. R. N. A., laquelle fait intervenir une hydrolyse par l'acide chlorhydrique de densité 1,12 en présence d'éthanol, à 75°C pendant 40 mn.

La concentration en acide chlorhydrique, la durée et la température ont été choisies de manière à obtenir une hydrolyse ménagée du produit afin de dissocier les complexes lipoprotéiques et glucidiques tout en minimisant la dégradation des lipides et la formation d'artefacts.

La présence simultanée d'un acide fort, d'acide formique et d'éthanol, conduit, à 75°C, à la formation d'un solvant des lipides, le formiate d'éthyle, suivant le mécanisme classique d'estérification catalysée par les ions $H^+$ :



L'acide formique en excès provoquant un fort gonflement des particules du produit, la diffusion des réactifs est facilitée, le formiate d'éthyle est formé *in situ*, simultanément, les lipides sont extraits. Il en résulte également que la taille des particules en dessous de 0,4-0,5 mm n'a pratiquement pas d'influence sur la quantité de lipides extraits. Ainsi, en utilisant une semoule de blé dur dont la granulation est comprise entre 0,4 et 0,5 mm, on obtient une teneur en lipides sensiblement identique

à celle trouvée à partir de la même semoule broyée (dimension des particules inférieure à 0,2 mm) soient les valeurs 2,10-2,05 pour la semoule telle quelle, 2,15-2,00 pour la semoule broyée.

Pour la majorité de produits céréaliers étudiés, une quantité de 8 g dans un volume total de réactifs de 28 ml est un optimum ; au-delà, la suspension est trop visqueuse et hétérogène, ce qui entraîne des difficultés d'hydrolyse et d'extraction. Le gluten, par contre, se différencie de la majorité des produits : il est nécessaire d'utiliser 2 g pour 28 ml de réactifs.

Lorsque la teneur en lipides est élevée, la quantité de produit à mettre en œuvre peut être réduite à 4 g en utilisant 14 ml de réactifs et un flacon d'hydrolyse et d'extraction de dimensions deux fois plus petites que celui représenté sur la figure 1 peut être utilisé. De toute façon, nous avons vérifié qu'en faisant varier la quantité de produit de 1 à 8 g, tout en conservant un volume total de réactifs constant (28 ml) les valeurs trouvées ne varient pas, quelle que soit la teneur en lipides du produit.

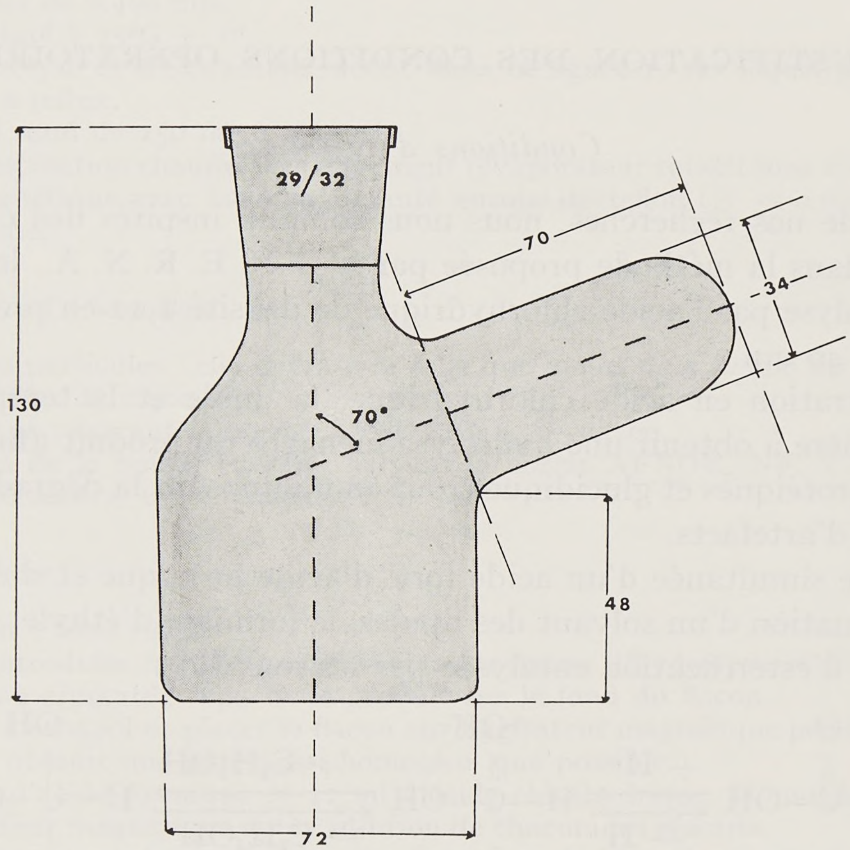



FIG. 1. — *Flacon d'hydrolyse et d'extraction*
Volume total : 317 ml. Volume du tube latéral : 52 ml. Cotes exprimées en mm

Nous avons étudié les conditions optimales d'hydrolyse, en expérimentant avec une farine de blé (tabl. 1 et 2). Après 40 mn d'hydrolyse à 80°C et à 75°C en présence d'acide chlorhydrique concentré ($d = 1{,}19$) on extrait par l'hexane, en même temps que les lipides, d'autres substances dont une forte proportion de composés furfuryliques mis en évidence par chromatographie sur couche mince. En utilisant de l'acide chlorhydrique de densité 1,12 la quantité de produits extractibles par l'hexane n'augmente que très faiblement à partir de 10 mn d'hydrolyse à 76°C et la présence de dérivés furfuryliques ne devient notable qu'à partir de 30 mn.

Le traitement mis en œuvre n'entraîne qu'une altération relativement limitée des lipides.

TABLEAU I

*Influence de la concentration en acide chlorhydrique et de la température sur la teneur en lipides d'une farine de blé*
(proportion des réactifs : HCl = 12 ml, HCOOH = 8 ml, $C_2H_5OH$ = 8 ml pour 8 g de produit)

| Conditions d'hydrolyse | Teneur en lipides (%) |
|---|---|
| 80°C, 40 mn<br>HCl concentré (*d* = 1,19) | 2,16—2,11 |
| 75°C, 40 mn<br>HCl concentré (*d* = 1,19) | 2,05—2,12 |
| 75°C, 15 mn<br>HCl dilué (*d* = 1,12) | 1,63—1,68<br>1,62 |

TABLEAU 2

*Teneurs en lipides d'une farine de blé, en fonction du temps d'hydrolyse à 75°C, en utilisant l'acide chlorhydrique de densité 1,12*
(la proportion des réactifs est celle indiquée dans le tableau 1)

| Temps en mn | 5 | 10 | 15 | 20 | 30 | 40 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Teneurs en « lipides » (%) | 1,42 | 1,60 | 1,62 | 1,62 | 1,65 | 1,66 |

L'hydrolyse des glycérides apparaît peu importante. Ainsi, la teneur en acides gras libres d'un extrait obtenu à partir de farine de blé est pratiquement identique à celle trouvée dans les lipides libres, soit 23,5 et 23 p. 100 respectivement. Il n'en est pas de même pour la méthode d'hydrolyse acide à l'ébullition où la quantité d'acides libres peut atteindre 50 p. 100 (1). Seuls les phospholipides apparaissent notablement hydrolysés. Pour deux types de farines examinés, les teneurs en azote et en phosphore (2) des lipides obtenus sont environ 2 à 3 fois plus faibles que celles des extraits obtenus par la méthode à l'azéotrope hexane-alcool, mais les rapports atomiques N/P, dans tous les cas supérieurs à 1, ne sont que légèrement plus faibles (tabl. 3).

(1) Les acides gras libres sont dosés par chromatographie en phase gazeuse en présence d'un étalon interne, après leur séparation globale sur couche mince de gel de silice et leur transformation en esters méthyliques.

(2) L'azote total est déterminé par la méthode Kjeldahl et le phosphore par la méthode de Machebœuf et Delsal (1943).

TABLEAU 3

*Comparaison des teneurs en phosphore et en azote ainsi que des rapports atomiques N/P des lipides de deux farines de blé extraits par la méthode proposée et par l'azéotrope hexane-éthanol*

| | Méthode proposée | | | | Méthode azéotrope hexane-éthanol | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Lipides extraits (%) | N (%) | P (%) | Rapport atomique N/P | Lipides extraits (%) | N (%) | P (%) | Rapport atomique N/P |
| Farine de blé courante | 1,65 | 0,17 | 0,19 | 2,0 | 1,75 | 0,53 | 0,49 | 2,4 |
| Farine enrichie en protéines | 2,76 | 0,14 | 0,22 | 1,40 | 2,88 | 0,37 | 0,48 | 1,7 |

On doit remarquer que toutes les méthodes de dosage des lipides du blé conduisent à des rapports N/P supérieurs à 1 comme l'indiquent les valeurs rapportées par McKillikan *et al.* (1968) dans le tableau 4.

TABLEAU 4

*Comparaison des teneurs en phosphore et en azote ainsi que des rapports atomiques N/P des lipides d'une farine de blé extraits par différentes méthodes*

D'après McKillikan *et al.* (1968)

| Méthodes | N total (%) | P total (%) | N/P |
|---|---|---|---|
| Bligh et Dyer (1959) (extraction $CHCl_3$ $CH_3OH$, $H_2O$) | 0,74 | 0,68 | 2,4 |
| Extraction à l'éther de pétrole | 0,71 | 0,24 | 6,6 |
| Éthanol | 0,94 | 0,74 | 2,8 |
| A. A. C. C. (hydrolyse acide) | 0,07 | 0,06 | 2,6 |
| Butanol saturé d'eau (purification par l'hexane) | 0,81 | 0,56 | 3,2 |
| Butanol saturé d'eau (purification sur Sephadex LH 20) | 0,51 | 0,63 | 1,8 |

Les conditions d'hydrolyse retenues provoquent une interestérification partielle des acides gras, mise en évidence par la présence d'esters éthyliques dans les extraits, à des doses difficiles à estimer [1].

Les extraits ne contiennent pas de substances « non lipidiques » ; après leur lavage suivant la technique de FOLCH *et al.* [2], on récupère intégralement la quantité initiale d'extrait mise en œuvre (tabl. 5, colonnes 5 et 7). Il n'en est pas de même lorsqu'on effectue la même opération sur les extraits obtenus par la méthode à l'azéotrope hexane-éthanol (1) [3] 10,25 p. 100 de produits étant solubles dans la phase aqueuse (6). La teneur en lipides « vrais » est alors très voisine de celle obtenue par la méthode proposée (5). Par ailleurs, lorsque les extraits d'une farine de blé obtenus par l'azéotrope hexane-éthanol (1) sont soumis à l'hydrolyse acide dans les conditions décrites, la quantité de lipides finalement récupérée (2) est notablement inférieure à la quantité initiale d'extrait utilisé ; la présence de divers acides aminés dans la phase aqueuse après hydrolyse et extraction a été mise en évidence à l'aide d'un analyseur automatique Technicon. De plus, la farine résiduelle après traitement à l'hexane-éthanol contient encore une quantité non négligeable de lipides (3) dosée par la méthode proposée ; la somme (4) des lipides (2 + 3) correspond alors sensiblement à la valeur trouvée après hydrolyse de la farine initiale (5).

TABLEAU 5

*Teneurs en lipides « vrais » d'une farine de blé et d'une semoule de blé dur*
(exprimées en p. 100 par rapport à la substance telle quelle)

| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | p. 100 de lipides extraits azéotrope hexane-éthanol | p. 100 de lipides après traitement des extraits de 1 par la méthode proposée | p. 100 de lipides de la farine résiduelle de 1 (dosée par la méthode proposée) | p. 100 de lipides « vrais » (2 + 3) | p. 100 de lipides extraits par la méthode proposée | p. 100 après purification de l'extrait I, suivant FOLCH | p. 100 de lipides après purification de l'extrait 5, suivant FOLCH |
| Farines de blé courantes | 1,80<br>1,44 | 1,36<br>1,20 | 0,25<br>0,36 | 1,61<br>1,56 | 1,70<br>1,60 | —<br>— | —<br>— |
| Semoule | 2,64 | — | — | — | 2,38 | 2,43 | 2,36 |

Ces résultats montrent que la méthode à l'azéotrope hexane-éthanol conduit à l'extraction de substances qui, bien que solubles dans l'hexane, ne peuvent être considérées comme des lipides. Ces substances sont vraisemblablement constituées, en

(1) Les esters éthyliques sont caractérisés par chromatographie en phase gazeuse après séparation partielle sur couche mince de gel de silice.
(2) On utilise une solution aqueuse de $Cl_2Ca$ anhydre à 0,04 p. 100 pour éviter la perte en phosphatides et la formation d'une émulsion stable.
(3) Les chiffres entre parenthèses correspondent aux colonnes du tableau 5.

majeure partie, de lipoprotéines ; il est bien connu en effet que certaines d'entre elles sont extractibles par des solvants tels que l'hexane, c'est le cas, en particulier, de la lipopurothionine de blé (BALLS, HALE et HARRIS, 1942), dont la partie protéique a une masse moléculaire de l'ordre de 10 000. L'intervention d'une hydrolyse acide dans les conditions que nous avons mises au point apparaît donc judicieuse puisqu'elle permet de libérer les lipides engagés dans de tels complexes. Il en est d'ailleurs de même dans les produits ayant subi des traitements mécaniques ou thermiques tout particulièrement, capables de provoquer des associations lipides-protéines et lipides-glucides ; ceci est bien prouvé par les résultats obtenus avec les semoules et les pâtes alimentaires correspondantes, le soja toasté (tabl. 6) et divers produits de cuisson à base de farine de blé (tabl. 7).

TABLEAU 6

*Comparaison des résultats obtenus par différentes méthodes, à partir de divers produits*

Les chiffres entre parenthèses indiquent le nombre de déterminations effectuées. Les valeurs sont en général indiquées en p. 100 par rapport à la substance telle quelle, sauf pour la semoule et les pâtes correspondantes où elles sont données en p. 100 par rapport à la substance sèche.

| Produits | Méthode proposée | Méthode hexane-éther (lipides libres) | Méthode azéotrope hexane-éthanol | Méthode hydrolyse HCl à l'ébullition |
|---|---|---|---|---|
| Amidon de blé | 0,06 ± 0,03 (3) | | | |
| Amidon + 2 p. 100 d'huile d'olive | 2,07 ± 0,08 (3) | | | |
| Farine de blé | 1,65 ± 0,05 (6) | 1,30 (1) | 1,75 ± 0,15 (2) | 1,40 ± 0,03 (2) |
| Farine enrichie en protéines | 2,76 ± 0,03 (3) | | 2,88 (1) | 2,60 ± 0,05 (2) |
| Blé entier broyé | 2,54 ± 0,07 (4) | | | 2,40 (1) |
| Germes de blé | 12,37 ± 0,08 (3) | 12,60 ± 0,70 (3) | | 5,80 ± 0,08 (2) |
| Semoule de blé | 2,38 ± 0,07 (6) | | 2,64 ± 0,10 (4) | |
| Pâtes alimentaires | 2,34 ± 0,03 (3) | | 2,77 ± 0,15 (4) | |
| Aliments du bétail orge + luzerne + minéraux | 3,50-3,52 | 2,75 | | |
| Blé + luzerne + minéraux | 3,28-3,34 | 2,77 | | |
| Luzerne | 2,61-2,88 | 1,86 | | |
| Farine de soya toasté | 2,01-2,12 | 0,75 | | |
| Maïs entier broyé | 4,90-4,91 | 4,56 | | |

TABLEAU 7

*Dosage des lipides dans un pain de mie,*
*dans un pain enrichi en protéines et dans un biscuit*

La teneur théorique est calculée en tenant compte de la teneur en lipides de la farine initiale et de la quantité de matières grasses ajoutée ainsi que de la proportion des différents constituants mis en œuvre. Les valeurs obtenues sont indiquées en p. 100 par rapport à la matière sèche.

| Produits | Méthode proposée | Méthode hydrolyse HCl à l'ébullition | Méthode extraction hexane-éther (lipides libres) | Teneur théorique |
|---|---|---|---|---|
| Pain de mie | 4,22 ± 0,02 (2) | 3,80 (1) | 2,95 (1) | 4,25 |
| Pain enrichi en protéines | 4,62 ± 0,005 (2) | 3,55 (1) | 2,40 (1) | 4,66 |
| Biscuit | 8,01 ± 0,1 (5) | 6,83 (1) | 6,68 (1) | 8,10 |

On constate de plus que, dans ce dernier cas, on retrouve pratiquement la quantité de matière grasse présente initialement alors que la teneur en lipides libres est faible. Il découle également de ces mêmes tableaux que, quels que soient les produits examinés, les teneurs en lipides trouvées par la méthode proposée sont, en général, plus élevées que celles correspondant aux lipides libres ou à ceux fournis par la méthode d'hydrolyse acide à l'ébullition, mais plus faibles que celles données par la méthode utilisant l'azéotrope hexane-éthanol pour les raisons indiquées précédemment.

Une partie des observations effectuées au cours de cette étude trouve son illustration dans les chromatogrammes sur couche mince des lipides obtenus par les différentes méthodes examinées (fig. 2).

## *Conditions d'extraction*

En utilisant un perforateur liquide-liquide, le rendement de l'extraction par l'hexane ou l'éther éthylique est très faible. Par contre, l'agitation du mélange phase aqueuse-solvant au moyen d'un barreau magnétique, tournant à vitesse convenable, provoque la formation d'une émulsion favorisant l'extraction rapide des lipides. Toutefois, l'addition d'éthanol après hydrolyse est nécessaire pour diminuer la viscosité du mélange et obtenir une meilleure séparation des phases. L'utilisation d'un solvant légèrement polaire comme l'éther diéthylique conduit à l'extraction de composés non lipidiques, par contre l'hexane permet d'extraire rapidement les lipides de leur solution dans le formiate d'éthyle, sans entraîner des quantités notables d'eau et d'autres produits.

Là encore, la diffusion du solvant à l'intérieur des particules du produit est facilitée par l'état de gonflement élevé, résultant de l'action de l'acide formique. Aussi, dans la plupart des cas, l'extraction des lipides est totale après trois opérations.

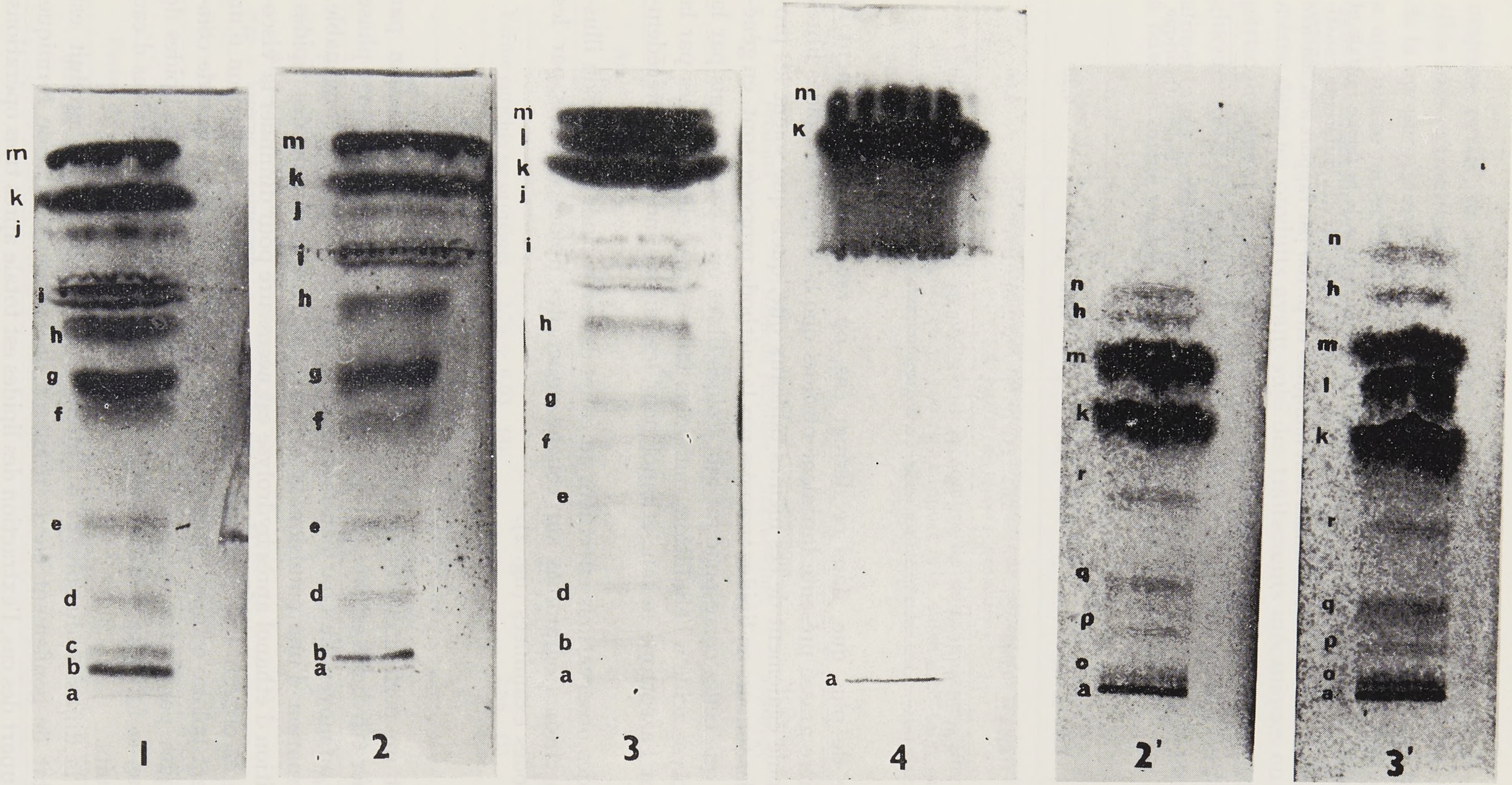



FIG. 2. — *Chromatogrammes sur couche mince réalisés par la technique de* GRAVELAND (1968)

1, 2, 3, 4 : séparation des lipides polaires et apolaires. 2′, 3′ : séparation des lipides apolaires (la quantité de lipides appliquée en 3′ est supérieure à celle appliquée en 2′). Les lipides examinés sont ceux d'une semoule de blé dur extraits par différentes méthodes : azéotrope hexane-éthanol (1), azéotrope hexane-éthanol, purification suivant FOLCH (2), méthode proposée (3), hydrolyse acide à ébullition, séchage des extraits par un courant d'azote (4).

*a* : dépôt, *b* : lysolécithines, *c* : constituant inconnu, *d* : lécithines, *e* : phosphatidyl éthanolamine, *f* : constituant inconnu, *g* : acide phosphatidique, *h* : glycolipides, *i* : stérols et constituants inconnus, *j* : constituant inconnu, *k* : acides gras et monoglycérides, *l* : diglycérides et esters éthyliques, *m* : triglycérides et esters de stérols, *n* : esters de stérols, *o* et *p* : constituants inconnus, *q* : monoglycérides, *r* : constituant inconnu.

Afin de réduire au maximum les transvasements et d'éviter ainsi des pertes en lipides, nous avons conçu un flacon permettant d'effectuer successivement l'hydrolyse et l'extraction. Celui-ci (fig. 1) est muni d'un rodage normalisé sur lequel vient s'adapter un réfrigérant utilisé au moment de l'hydrolyse ; il possède un tube latéral, d'un volume légèrement supérieur à celui du mélange réactionnel, qui permet ainsi de recueillir le solvant d'extraction sans risque d'entraînement de la phase aqueuse.

### *Conditions d'élimination des solvants*

L'utilisation d'un évaporateur rotatif sous vide (trompe à eau) conduit à l'élimination rapide (10 mn environ) de l'hexane et du formiate d'éthyle, lorsque le ballon est placé dans un bain d'eau à la température de 50-60°C. Elle évite également tout risque de pertes par entraînement mécanique de la solution au cours de la distillation.

Plusieurs méthodes recommandent l'étuvage du résidu à 105°C pour éliminer les petites quantités de solvant et d'eau susceptibles d'être encore présentes. Ce traitement est hautement préjudiciable à la précision du dosage car il provoque l'oxydation et la polymérisation d'une grande partie des acides insaturés. Ainsi, avec une farine de blé, en utilisant la méthode d'hydrolyse à l'ébullition, les lipides obtenus (contenant initialement environ 50 p. 100 d'acides gras libres) deviennent, après passage à 105°C, insolubles en grande partie (20 à 30 p. 100) dans l'hexane, mais solubles dans l'éther diéthylique. Par contre, lorsque les lipides sont traités, soit par un courant d'azote à température ordinaire, soit à 105°C en présence d'un antioxygène tel que le BHT, ils restent totalement solubles dans l'hexane.

Il n'est donc pas surprenant que les phénomènes se produisant lors du séchage à température élevée en présence d'oxygène entraînent des erreurs dans le dosage. Ainsi, on obtient des valeurs moyennes de 1,30 à 1,50 p. 100, respectivement après traitement à 105°C et après séchage à l'azote ou en présence de BHT.

C'est pourquoi nous préconisons le séchage au moyen du courant d'azote. En prenant soin de faire passer celui-ci immédiatement après distillation, lorsque la température du ballon est encore aux environs de 50°C, il n'y a pas de variation de masse après 5 mn. C'est pour des raisons de sécurité que nous avons prolongé la durée à 10 mn.

Dans le cas de produits riches en lipides, comme le germe de blé, la méthode d'hydrolyse à l'ébullition conduit à une erreur par défaut considérable puisque la quantité trouvée est environ deux fois plus faible que celle fournie par extraction à l'hexane et à l'éther diéthylique (tabl. 6). Il est fort probable que le séchage à 105°C du résidu organique obtenu après hydrolyse, provoque la combinaison partielle des lipides avec d'autres constituants, amenant ainsi leur insolubilisation dans l'hexane.

### *Répétabilité des résultats*

La différence entre les résultats de deux dosages, effectués simultanément sur un même échantillon, ne dépasse généralement pas 3 p. 100. Un opérateur bien entraîné peut même atteindre une répétabilité inférieure à 0,5 p. 100.

Une analyse circulaire portant sur divers produits céréaliers et aliments pour le bétail est en cours de réalisation à l'échelle internationale.

*Durée des opérations*

L'ensemble des opérations peut être réalisé en un peu moins de deux heures. La méthode se prête aisément à des déterminations en petites séries. Comparativement, les autres techniques d'hydrolyse acide demandent de 9 à 12 heures et les dosages par extraction au Soxhlet ou au Kumagawa sont encore plus longs.

## CONCLUSION

La méthode proposée présente de nombreux avantages par rapport à toutes les autres :

— détermination de la totalité des lipides, en particulier dans les produits ayant subi un traitement thermique,
— obtention de lipides peu dégradés,
— utilisation d'un matériel simplifié, permettant de limiter au maximum les pertes par transvasement,
— rapidité et facilité d'exécution, excellente répétabilité.

Des travaux sont entrepris en vue de l'étendre à d'autres produits.

*Reçu pour publication en mars 1975.*

## REMERCIEMENTS

Nous remercions le C. T. U., l'I. T. C. F., le Laboratoire des Industries des Céréales et Amylacés de l'E. N. S. I. A. pour les divers échantillons qu'ils nous ont fournis. Nos remerciements vont également à Mme Laval-Jeantet, du laboratoire de microradiographie du C. N. R. S., qui a bien voulu se charger de faire l'analyse des lipides par chromatographie sur couche mince.

## SUMMARY

### RAPID METHOD FOR THE QUANTITATIVE DETERMINATION OF TOTAL LIPIDS IN CEREAL PRODUCTS

A new method for determining the total lipids content of cereal products is proposed. Its principle is based on a moderated hydrolysis of the products by hydrochloric acid in the presence of formic acid and ethanol. Protein and carbohydrate-lipid complexes are disrupted, ethyl formate which is a lipids solvent is formed *in situ* under the catalytic effect of $H^+$ ions. After liquid-liquid extraction by n. hexane, followed by evaporation of solvents, the lipids are determinated gravimetically.

The method allows one to determine the total lipids content, particularly in thermically treated products, such as baked goods.

The use of a very simple apparatus allows to reduce to a maximum the lipids loss by transfer.

This method is easy and fast in performance and leads to repeatable results. It is quite suitable for small series determinations.

## ZUSAMMENFASSUNG


### SCHNELLE METHODE ZUR QUANTITATIVEN BESTIMMUNG DER GESAMTEN LIPIDEN IN GETREIDEPRODUKTEN

Die vorgeschlagene Methode ermöglicht die gesamten Lipide in Getreideprodukten zu bestimmen. Das Prinzip beruht auf einer schonenden Hydrolyse der Produkte mit Chlorwasserstoffsäure in Gegenwart von Ameisensäure und Aethylalkohol. Die komplex an Proteine oder Kohlenhydrate gebundenen Lipide werden abgespaltet und Ameisensäureaethylester, ein Lipidlösungsmittel, entsteht *in situ* durch die katalytische Wirkung der H-Ionen. Nach Extraktion mit Hexan-n in flüssiger Phase und Entfernung des Extraktionsmittels durch Abdampfen werden die Lipide durch Wägung bestimmt.

Die Methode hat den Vorteil die gesamten Lipide zu erfassen, insbesondere in Brot-, Back-, und Teigwaren.

Die Verwendung einer einfachen Apparatur gestattet die Verluste beim Umfüllen weitgehend zu vermeiden.

Die einfach und schnell durchzuführende Methode führt zu Ergebnissen die eine gute Repetabilität aufweisen und eignet sich gut für mittlere Serienversuche.


## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES


AMERICAN ASSOCIATION OF CEREAL CHEMISTS. Cereal laboratory methods (7th ed. 1962) A. A. C. C., Method, 30-10.

ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. Official methods of analysis (9th ed. 1960) Sec. 22033, 287.

BALLS A. K., HALE W. S., HARRIS T. H., 1942. A crystalline protein obtained from a lipoprotein of wheat flour. *Cereal Chem.*, **19**, 279-288.

BLIGH E. G., DYER W. J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, **37**, 911-917.

C. N. E R N. A., 1958. Cahiers techniques. III. Les méthodes analytiques des céréales. C. N. R. S., éd., 224-243.

FOLCH J., LEES M., SLOANE G. H. S., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, **226**, 497-509.

GRAVELAND A., 1968. Combination of T. L. C. and G. C. in the analysis on a microgram scale of lipids from wheat flour and wheat flour doughs. *J. Americ. Oil Chemists Soc.*, **45**, 834-840.

HADORN H., JUNGKUNZ R., 1952. In *Travaux de Chimie Alimentaire et d'Hygiène*, publiés par le Service Fédéral de l'Hygiène Publique à Berne. 1, **43**, 179-210.

MCKILLIKAN M. E., SIMS R. P. A., JOHNSTON F. B., MES J. C., 1968. Low-temperature anaerobic extraction of free and bound lipids from wheat flour. *Cereal Chem.*, **45**, 512-519.

MACHEBŒUF M., DELSAL J., 1943. Sur le dosage de très petites quantités de phosphates dans les matières organiques. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **25**, 116-120.

MECHAM D. K., MOHAMMAD A., 1955. Extraction of lipids from wheat products. *Cereal Chem.*, **32**, 405-415.

RECH J., 1968. Extraction quantitative des lipides des céréales. *Ann. Nutr. Alim.*, **22**, 11-15.

TSEN C. C., LEVI L., HLYNKA I., 1962. A rapid method for the extraction of lipids from wheat products. *Cereal Chem.*, **39**, 195-203.

ZIEGLER E. In *Schweizerisches Lebensmittelbuch*, Bern, 1964, Drucksachen und Materialzentrale, **1**, 534.

ZIEGLER E., 1968. Determination of total fat in cereals. In *Reports of the International Association for Cereal Chemistry*, 139-143.

*Ann. Technol. agric.*, 1975, **24** (2), 133-141.

# LA DÉCARBOXYLATION DES ACIDES CINNAMIQUES SUBSTITUÉS PAR LES LEVURES

G. ALBAGNAC

*Station de Technologie des Produits végétaux,*
*Centre de Recherches de Dijon, I. N. R. A.,*
*21034 Dijon Cedex*

## RÉSUMÉ

Il a été mis en évidence chez des levures appartenant aux genres *Saccharomyces* et *Hansenula*, cultivées sur milieu synthétique, la décarboxylation des acides cinnamiques en styrènes substitués correspondants. Pour cela, on a essentiellement utilisé la spectrophotométrie UV et la chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse.

La souche plus particulièrement étudiée, *S. cerevisiae* 28C, agit sur de nombreux acides cinnamiques substitués, naturels ou de synthèse. La structure phénylacrylique est indispensable et, de plus, la réaction est très nettement influencée par le nombre, la nature et la position des substituants sur le noyau benzénique.

Enfin, l'influence possible d'une telle réaction sur l'arôme de produits fermentés est discutée.

Mots clés : *levures, fermentation, acides cinnamiques, décarboxylation, arôme.*

## INTRODUCTION

Des travaux récents réalisés en couplage chromatographie en phase gazeuse — spectrométrie de masse ont montré que divers alkylphénols et plus particulièrement les dérivés vinyl-4 et éthyl-4 du phénol et du gaïacol sont généralement représentés parmi les composés volatils des produits fermentés (Dubois *et al.*, 1971 ; Nishimura et Masuda, 1971 ; Dubois et Brulé, 1972). Leurs très faibles seuils de perceptibilité, de l'ordre de quelques dizaines de p.p.b. en solution aqueuse, leur permettent certainement de jouer un rôle non négligeable dans l'arôme normal de tels produits. Bien que ces phénols volatils puissent provenir, en faibles quantités, lors du chauffage des moûts, de la dégradation thermique des acides cinnamiques (Fiddler *et al.*, 1967) ou même des acides aminés aromatiques (Kato *et al.*, 1971), leur formation dans le

cas des produits fermentés est due essentiellement au métabolisme microbien (WHITING et CARR, 1957, 1959 ; STEINKE et PAULSON, 1964 ; BRUMSTED *et al.*, 1965), les acides cinnamiques substitués du moût subissant une décarboxylation non oxydative, précédée ou suivie d'une réduction de la chaîne latérale (fig. 1). Dans le cas des

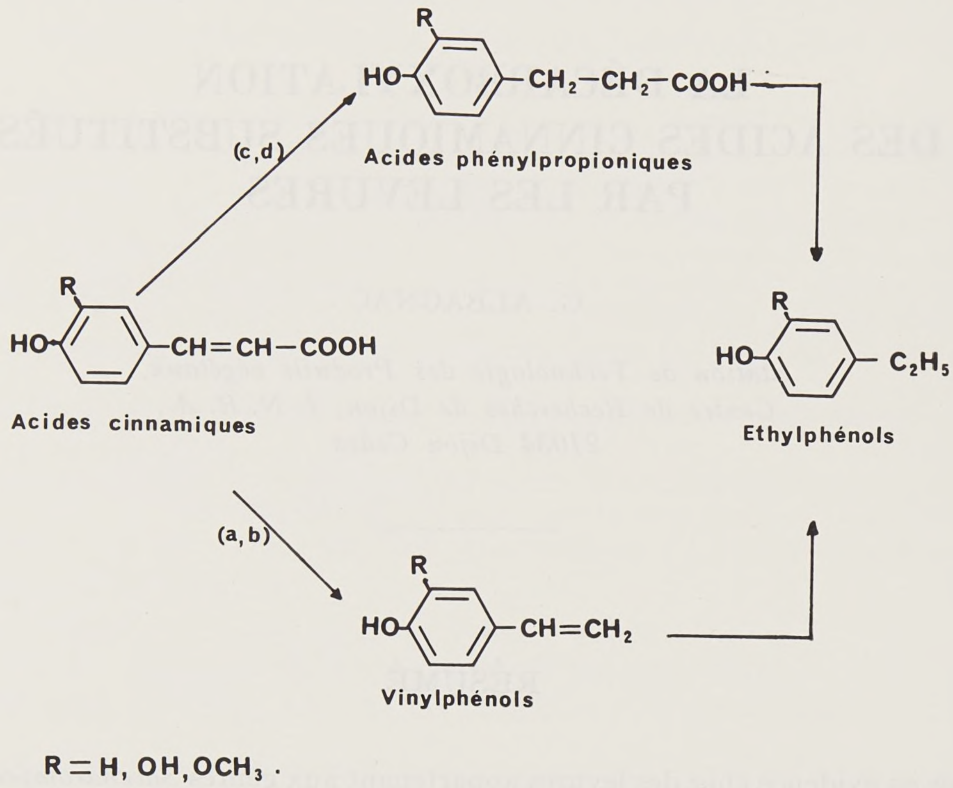



FIG. 1. — *Formation des vinylphénols et des éthylphénols par les bactéries*

a : *Aerobacter* (FINKLE *et al.*, 1962)
b : *Bacillus* (INDAHL et SCHELINE, 1968)
c, d : *Lactobacillus* (WHITING et CARR, 1957-1959)

levures, certaines souches sont capables de produire des quantités d'alkylphénols suffisantes pour influencer de façon plus ou moins favorable l'arôme d'un produit fermenté (BRUMSTED *et al.*, 1965 ; YOKOTSUKA *et al.*, 1965). Il nous a donc paru intéressant de préciser le mode d'action des levures sur les acides phénols et de voir si l'on pouvait le rapprocher de celui bien établi chez *Aerobacter* (FINKLE *et al.*, 1962) ou *Lactobacillus* (WHITING et CARR, 1957, 1959). Nous avons pu mettre en évidence chez les genres *Saccharomyces* et *Hansenula* la décarboxylation d'un grand nombre d'acides cinnamiques substitués, naturels ou de synthèse ; l'intensité de la réaction, relativement modeste, est très nettement influencée par le nombre, la nature et la position des substituants sur le noyau benzénique.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 1. — *Souches et milieu de culture*

Les souches de levures utilisées proviennent de la collection de la Station de Technologie des Produits végétaux de Dijon. La levure plus spécialement étudiée ici, *Saccharomyces cerevisiae* 28C, initialement isolée d'une vendange chauffée de Bourgogne, a été conservée sur milieu au malt Wickerham gélosé, en tubes inclinés.

Précultures et cultures sont effectuées sur le milieu suivant :

| | |
|---|---|
| glucose | 100 g |
| yeast nitrogen base (Difco) | 7 g |
| phosphate monosodique | 13 g |
| eau q.s.p. | 1 l |

pH ajusté à 4,5 ; autoclavage 20 mn à 118°C.

La préculture est conduite en fiole à plasma de 500 ml contenant 100 ml de milieu, ensemencée à la boucle de platine et incubée pendant 19 h à 29°C sur agitateur rotatif.

Le milieu de culture contient de plus 0,3 µM/ml d'acide cinnamique substitué introduit sous forme de solution alcoolique ou d'une solution aqueuse de son sel de potassium, stérilisée par filtration. Les essais sont réalisés en fiole à plasma contenant 100 ml de milieu, ensemencée par 1 ml de préculture et incubée dans les mêmes conditions que celle-ci.

### 2. — *Synthèse des acides cinnamiques et des styrènes substitués*

Les acides aromatiques utilisés sont en général des produits Fluka. Cependant, certains acides cinnamiques substitués, non disponibles dans le commerce, ont été préparés par condensation de l'aldéhyde benzoïque approprié avec l'acide malonique : dans l'éthanol sous reflux pour les dérivés méthoxylés (Walling et Wolfstirn, 1947), dans la pyridine à froid pour les dérivés hydroxylés (Pearl et Beyer, 1951). Enfin, l'acide triméthoxy-3, 4, 5 cinnamique a été obtenu par méthylation totale de l'acide sinapique par le sulfate de diméthyle et saponification dans la soude de l'ester obtenu. Les 3 isomères du méthoxystyrène et quelques diméthoxystyrènes ont été préparés par décarboxylation thermique des acides cinnamiques correspondants, selon la méthode de Walling et Wolfstirn (1947).

### 3. — *Chromatographie en phase gazeuse; spectrométrie de masse*

Elle a été réalisée sur un chromatographe Girdel 3000 couplé avec un spectromètre de masse Varian MAT CH5. Les conditions opératoires sont les suivantes :

— colonne : acier inox : 10′ × 1/8″
remplissage gaz chrom Q (80 — 100 mesh), silanisé et imprégné par 2 p. 100 de silicone OV 17
— gaz vecteur : hélium (20 ml/mn)
— température d'injecteur : 250°C
— programmation de température : 100 à 200°C à 3°C/mn ou 80 à 200°C à 3°C/mn pour les méthoxystyrènes
— température du système d'introduction : 200°C
— température de la source d'ions : 250°C
— énergie des électrons : 70 eV.

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

### 1. — *Mise en évidence de la décarboxylation des acides cinnamiques par les levures*

*a*) La spectrophotométrie UV s'est révélée particulièrement commode pour sélectionner rapidement les souches susceptibles de décarboxyler les acides cinnamiques substitués. En effet, la perte du carboxyle entraîne la disparition d'une des doubles liaisons conjuguées de la molécule et l'on doit observer en cas de test positif un déplacement hypochrome dans le spectre d'absorption du milieu de culture fermenté (fig. 2). Dans le cas d'acides non décarboxylés ou de souches donnant un test négatif, on observe un spectre d'absorption UV pratiquement inchangé, ce qui élimine la possibilité d'une dégradation spontanée de ces acides dans le milieu de culture.

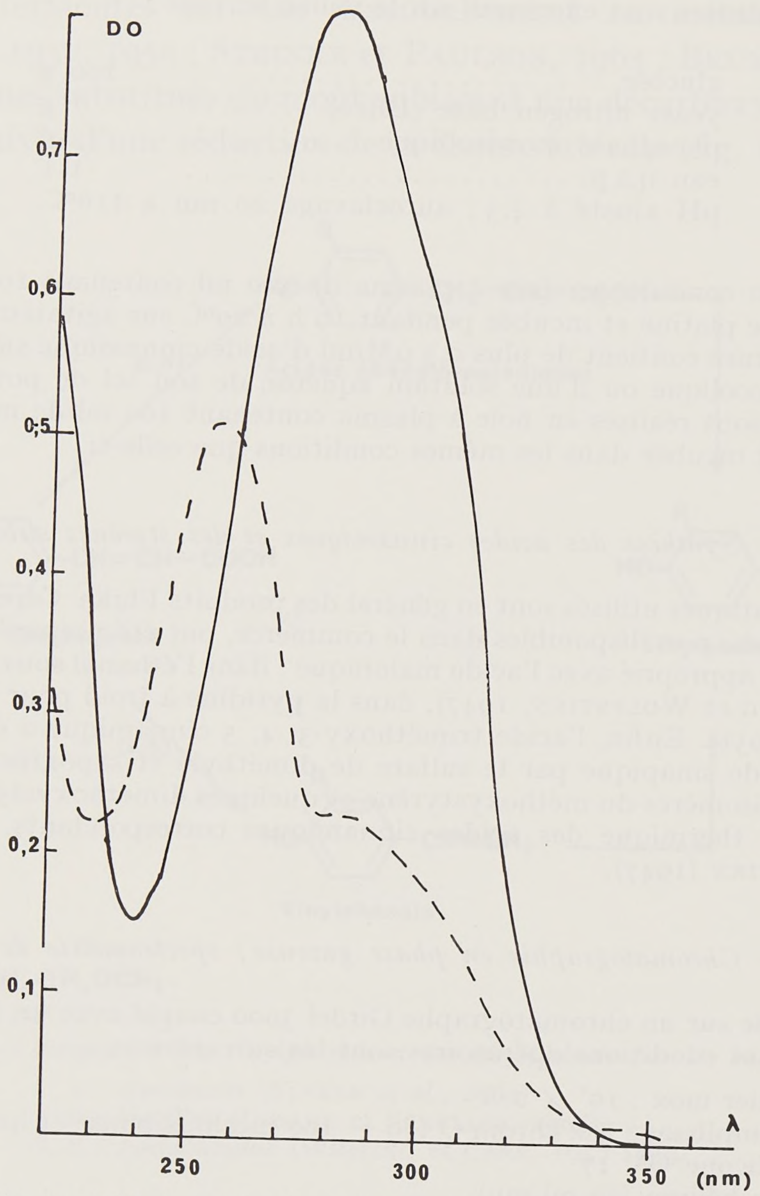



FIG. 2. — *Spectre UV du milieu de culture renfermant 0,5 mM par litre d'acide* p-*coumarique dilué au 1/10 dans le tampon phosphate pH 6*
——— : milieu de culture initial
- - - - - - : milieu de culture après 30 h d'incubation par *S. cerevisae* 28C

TABLEAU I

*Spectres de masse des méthoxystyrènes et de quelques diméthoxystyrènes*
*Intensités relatives en pourcentages du pic de base* (moyenne de 3 spectres obtenus en couplage)

| Composé | m/e | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 164 | 149 | 135 | 134 | 133 | 121 | 119 | 106 | 105 | 104 | 103 | 91 |
| Méthoxy-2 styrène | — | — | — | 53 | — | — | 57 | — | 7 | 5 | 12 | 100 |
| Méthoxy-3 styrène | — | — | — | 100 | — | — | 10 | — | 14 | 37 | 22 | 55 |
| Méthoxy-4 styrène | — | — | — | 100 | — | — | 62 | — | 2 | 5 | 6 | 72 |
| Diméthoxy-2,4 styrène | 100 | 84 | 13 | 7 | 8 | 97 | 18 | 11 | 14 | 3 | 9 | 47 |
| Diméthoxy-2,5 styrène | 100 | 62 | — | 7 | 3 | 63 | 2 | 11 | 3 | 1 | 3 | 48 |
| Diméthoxy-3,4 styrène | 100 | 54 | — | — | 1 | 32 | 3 | 5 | 2 | 3 | 31 | 44 |
| Diméthoxy-3,5 styrène | 100 | 3 | 39 | 14 | 4 | 11 | 4 | 6 | 17 | 13 | 10 | 27 |

*b*) En cas de test dans l'UV positif, la nature exacte du produit obtenu après incubation des acides cinnamiques en présence de la souche de levure a été établie par chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse, et vérifiée par comparaison des volumes de rétention et des spectres de masse avec ceux de styrènes substitués de synthèse. Pour cela, un extrait éthéré du milieu de culture a été chromatographié dans deux conditions : tel quel et après silylation par l'(O, N-bistriméthylsilyl) acétamide ou BSA, l'intérêt de la deuxième technique étant de transformer les acides cinnamiques substitués en dérivés volatils stables et d'infirmer leur éventuelle dégradation thermique dans l'injecteur du chromatographe. Si le spectre de masse des vinylphénols et vinylgaïacols s'est montré assez peu influencé par la position relative des substituants et de la chaîne latérale, il n'en est pas de même dans le cas des méthoxystyrènes et diméthoxystyrènes identifiés (tabl. 1). Cela est particulièrement net dans le cas des monométhoxystyrènes où les fragmentations de l'isomère *méta* sont très analogues à celles du méthoxybenzène (anisole) ; par contre dans le cas des dérivés *para* et surtout *ortho*, la perte d'un radical méthyl suivie du départ de monoxyde de carbone, conduisant aux pics m/e 119 et m/e 91, est très nettement favorisée par rapport à l'élimination de formaldéhyde et du radical méthoxyle à partir de l'ion moléculaire, donnant respectivement les pics m/e 104 et m/e 103.

### 2. — *Souches décarboxylant les acides cinnamiques substitués et nature des acides aromatiques dégradés*

L'aptitude à décarboxyler les acides férulique et *p*-coumarique a été mise en évidence chez des levures appartenant aux genres *Saccharomyces* et *Hansenula* (tabl. 2).

TABLEAU 2

*Décarboxylation des acides* p-*coumarique et férulique par quelques souches de levures*

| Espèces | Nbre de souches testées | Nbre de tests positifs |
|---|---|---|
| *Candida guillermondi* | 1 | 0 |
| — *krusei* | 1 | 0 |
| — *mycoderma* | 1 | 0 |
| — *pseudotropicalis* | 1 | 0 |
| *Hansenula anomala* | 1 | 1 |
| *Pichia fermentans* | 1 | 0 |
| *Saccharomyces carlsbergensis* | 7 | 4 |
| — *cerevisiae* | 19 | 15 |
| — *rosei* | 3 | 1 |
| — *uvarum* | 4 | 2 |
| *Schizosaccharomyces acidodevorans* | 1 | 0 |
| — *liquefasciens* | 1 | 0 |
| — *octosporus* | 1 | 0 |
| — *pombe* | 1 | 0 |
| — *versatilis* | 1 | 0 |

Cependant, cette réaction ne peut être considérée comme un caractère constant d'une espèce. Par ailleurs, aucune des souches essayées ne s'est montrée active vis-à-vis de l'acide caféique ce qui, *a priori*, nous indique que le mode d'action des levures et des bactéries est différent (FINKLE *et al.*, 1962 ; WHITING et CARR, 1957-1959).

TABLEAU 3

*Décarboxylation des acides cinnamiques substitués par* S. cerevisiae *28C*

| | Intensités relatives de décarboxylation |
|---|---|
| Cinnamique | + + + + |
| *o*-coumarique | — |
| *m*-coumarique | + |
| *p*-coumarique | + + |
| Méthoxy-2 cinnamique | + + + |
| Méthoxy-3 cinnamique | + + + |
| Méthoxy-4 cinnamique | + + + + |
| Férulique | + + + |
| Isoférulique | + + |
| *o*-férulique (hydroxy-2 méthoxy-3 cinnamique) | + |
| Diméthoxy-2,4 cinnamique | + + + |
| Diméthoxy-2,5 cinnamique | + + + |
| Diméthoxy-3,4 cinnamique | + + + |
| Diméthoxy-3,5 cinnamique | + + + |
| Sinapique | — |
| Triméthoxy-3,4,5 cinnamique | — |

La nature des acides aromatiques susceptibles d'être décarboxylés a été étudiée plus en détail chez *Saccharomyces cerevisiae* 28C (tabl. 3) et les résultats obtenus viennent confirmer l'hypothèse ci-dessus. Cette souche s'est montrée inactive vis-à-vis des acides *p*-hydroxybenzoïque et hydroxy-4 méthoxy-3 benzoïque (vanillique), *p*-hydroxyphénylacétique, *p*-hydroxyphénylpropionique (phlorétique), hydroxy-4 méthoxy-3 phénylpropionique (dihydroférulique), alors que leurs homologues de la série cinnamique, les acides *p*-coumarique et férulique, sont respectivement transformés en vinyl-4 phénol et vinyl-4 gaïacol. Une structure phénylacrylique est donc indispensable pour permettre la décarboxylation, c'est la seule analogie que nous avons pu établir avec les résultats rapportés chez deux espèces bactériennes : *Aerobacter aerogenes* (FINKLE *et al.*, 1962) et *Bacillus pumilus* (INDAHL et SCHELINE, 1968). La levure et les bactéries indiquées ci-dessus divergent par leur aptitude à décarboxyler les différents acides cinnamiques substitués. Les deux espèces bactériennes citées exigent un hydroxyle peu encombré stériquement en *para* de la chaîne latérale. Dans le cas de *S. cerevisiae* 28 C, non seulement la présence d'un 4-hydroxyle n'est pas indispensable mais l'on constate, de plus, que la décarboxylation est nettement favorisée par la présence de groupements méthoxyles sur le noyau benzénique et par la position d'un substituant en *para* de la chaîne latérale. Par ailleurs, son

intensité décroît avec l'augmentation du nombre de substituants. Enfin, Mannito (1974) a étudié la stoechiométrie de la réaction et montré que la décarboxylation des acides cinnamiques substitués par *S. cerevisiae* 28C respectait la position et l'orientation de l'hydrogène en α du carboxyle.

Les intensités de décarboxylation rapportées dans le tableau 3 appellent quelques commentaires. Elles ont été obtenues par la mise en parallèle de la multiplication des levures (néphélométrie à 575 nm) et de la disparition de l'acide dans le milieu de culture (fig. 3). L'acide est déterminé spectrophotométriquement dans l'UV après purification par extraction à l'éther et reprise dans le tampon phosphate pH 7. Ces courbes, utiles pour fournir des résultats comparatifs, donnent une estimation des quantités de vinylphénols susceptibles d'être produites par les levures lors de la fermentation d'un milieu à 100 g par litre de sucre. Dans ces conditions, les acides férulique et *p*-coumarique à des concentrations respectives de 0,3 et 0,2 millimole par litre sont entièrement décarboxylés.

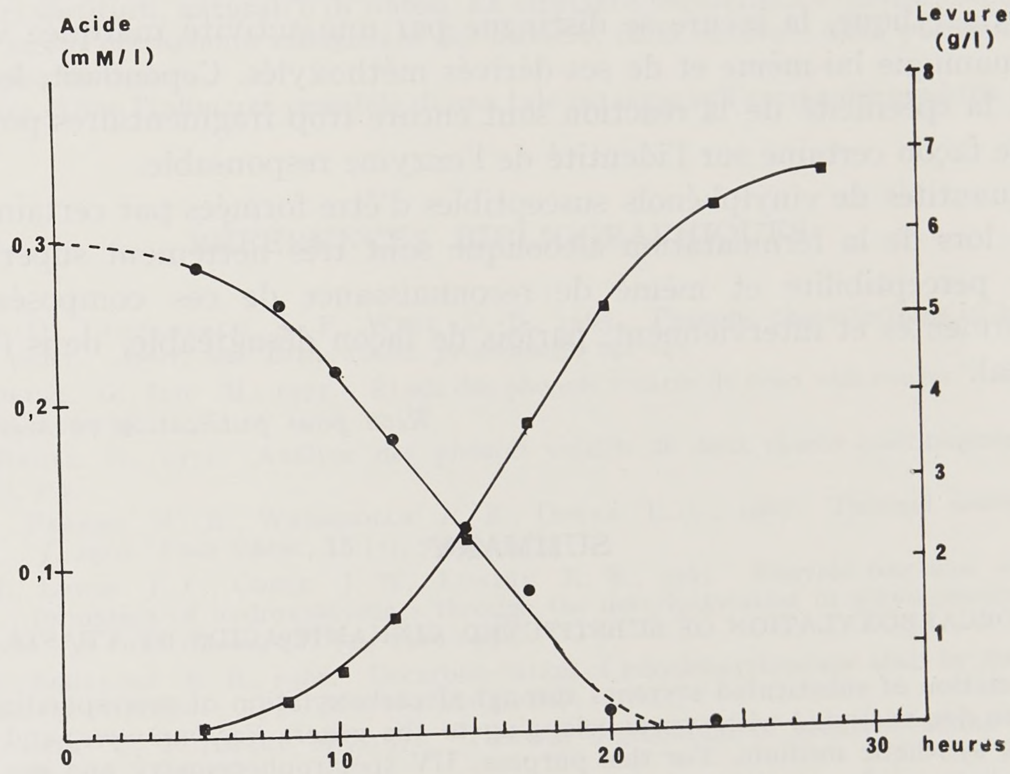



Fig. 3. — *Fermentation d'un milieu de culture renfermant 0,3 mmole par litre d'acide férulique par* Saccharomyces cerevisiae *28 C*

■——■ Croissance des levures
●——● Disparition de l'acide du milieu de culture

## 3. — *Discussion*

La formation par les levures de vinylphénols à des concentrations supérieures à 1 mg/l est responsable de l'apparition de mauvais goûts « phénoliques » en brasserie et en distillerie (Steinke et Paulson, 1964 ; Brumsted *et al.*, (1965). A notre connaissance, aucun accident de ce genre n'a été signalé en vinification. Apparemment, cela s'explique par les teneurs très différentes du matériel végétal de départ en acides cinnamiques substitués libres. Selon Ribereau-Gayon (1964), la baie de raisin ne contient que très peu d'acides phénoliques libres, essentiellement situés dans la pellicule et les pépins qui en renferment moins de 0,1 mg par kg de baies. Par contre, Steinke et Paulson (1964) trouvent dans l'orge environ 10 mg par kilo d'acides

férulique et *p*-coumarique libres, teneur encore augmentée lors du chauffage du moût. En vinification, la formation par le métabolisme microbien de vinylphénols en quantités suffisantes pour influencer de façon néfaste l'arôme du produit fini est limitée, non pas par l'activité des levures elles-mêmes, mais par la quantité de précurseur présente. L'extraction et l'hydrolyse enzymatique de combinaisons des acides cinnamiques substitués lors de la fermentation permettent cependant la formation des traces de vinyl-4 phénol et vinyl-4 gaïacol retrouvées dans les vins.

## CONCLUSION

La décarboxylation des acides cinnamiques substitués mise en évidence chez *Saccharomyces cerevisiae* 28C est nettement différente de celle réalisée par la décarboxylase des acides hydroxy-4 cinnamiques trouvée chez *Aerobacter* et *Bacillus*.

Bien que tous ces micro-organismes agissent uniquement sur des acides de la série phénylacrylique, la levure se distingue par une activité marquée vis-à-vis de l'acide cinnamique lui-même et de ses dérivés méthoxylés. Cependant, les résultats acquis sur la spécificité de la réaction sont encore trop fragmentaires pour pouvoir conclure de façon certaine sur l'identité de l'enzyme responsable.

Les quantités de vinylphénols susceptibles d'être formées par certaines souches de levures lors de la fermentation alcoolique sont très nettement supérieures aux limites de perceptibilité et même de reconnaissance de ces composés dans les produits fermentés et interviennent, parfois de façon désagréable, dans l'arôme du produit final.

*Reçu pour publication en avril 1975.*


## SUMMARY

### DECARBOXYLATION OF SUBSTITUTED CINNAMIC ACIDS BY YEASTS

The formation of substituted styrenes through decarboxylation of corresponding cinnamic acids has been demonstrated with yeasts belonging to the genera *Saccharomyces* and *Hansenula* growing on a synthetic medium. For this purpose, UV spectrophotometry and gas chromatography have been used.

The strain studied in this paper, namely *S. cerevisiae* 28C, decarboxylates many cinnamic acids either synthetic or from natural sources. A phenylacrylic structure is required for the reaction and its extend is dependent on the number, the nature and the position of substituents on the aromatic ring.

The possible incidence of such a reaction on the aroma of fermented products is discussed.



## RESUMEN

### LA DECARBOXILACION DE LOS ACIDOS CINÁMICOS SUBSTITUIDOS POR LAS LEVADURAS

Se ha puesto claramente en evidencia para levaduras pertenecientes a los géneros *Saccharomyces* y *Hansenula*, cultivadas en medio sintético, la decarboxilación de los ácidos cinámicos en los estirenos substituídos correspondientes. Para ello se ha utilizado principalmente la espectrofotometría ultravioleta y la cromatografía en fase gaseosa, en combinación con la espectrometría de masa.

Particularmente, una de los cepas estudiadas, la *S. cerevisiae 28C*, actúa sobre numerosos ácidos cinamicos substituídos, naturales o sintéticos. Es indispensable la estructura fenilacrílica y la reacción es además muy influenciada por el número, el género y la posición de los substituyentes en el núcleo bencénico.

Se discute finalmente la posible acción de tal reacción sobre el aroma de los productos de fermentación.

## RIASSUNTO

### LA DECARBOSSILAZIONE DEGLI ACIDI CINNAMICI SOSTITUITI DAI LIEVITI

Nei lieviti appartenenti al genere *Saccharomyces* e *Hansenula*, coltivati su mezzo sintetico, è stata messa in evidenza la decarbossilazione degli acidi cinnamici in stireni sostituiti corrispondenti. Per ottenere cio', si è fatto ricorso essenzialmente alla spettrofotometria UV e alla gas-cromatografia unita alla spettrometria di massa.

Il genere che è stato più specialmente studiato, il *S. cerevisiae 28C*, agisce su numerosi acidi cinnamici sostituiti, naturali o di sintesi. La struttura fenilacrilica è indispensabile e inoltre, la reazione è molto nettamente influenzata dal numero, dalla natura e dalla posizione dei sostituenti sul nucleo benzenico.

E' discussa infine l'influenza possibile di una tale reazione sull'aroma dei prodotti fermentati.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

BRUMSTED D. D., LAUTENBACH A. F., WEST D. B., 1965. Phenolic characteristics in brewing. III. The role of yeast. *Amer. Soc. Brew. Chem. proceedings*, 142-145.

DUBOIS P., BRULE G., ILIC M., 1971. Étude des phénols volatils de deux vins rouges. *Ann. Technol. agric.*, **20** (2), 131-139.

DUBOIS P., BRULE G., 1972. Analyse des phénols volatils de deux rhums martiniquais, *Ind. agr. alim.*, **89** (1), 7-9.

FIDDLER W., PARKER W. E., WASSERMAN A. E., DOERR R. C., 1967. Thermal decomposition of ferulic acid. *J. agric. Food Chem.*, **15** (5), 757-761.

FINKLE B. J., LEWIS J. C., CORSE J. W., LUNDIN R. E., 1962. Enzyme reactions with phenolic compounds : formation of hydroxystyrenes through the decarboxylation of 4-hydroxycinnamic acids by *Aerobacter*. *J. Biol. Chem.*, **237** (9), 1926-1931.

INDAHL S. R., SCHELINE R. R., 1968. Decarboxylation of 4-hydroxycinnamic acids by *Bacillus* strains isolated from rat intestine. *Appl. Microb.*, **16** (4), 667.

KATO S., KURATA T., FUJIMAKI M., 1971. Thermal degradation of aromatic amino acids. *Agr. Biol. Chem.*, **35** (13), 2106-2112.

MANNITO P., GRAMATICA P., RANZI B. M., MONTI D., 1974. *Stéréochimie de la décarboxylation des acides cinnamiques chez* Saccharomyces cerevisiae. Compte rendu de l'assemblée générale annuelle du Groupe polyphénols, Lyon, 1974.

NISHIMURA K., MASUDA M., 1971. Minor constituents of whisky fusel oils. I. Basic, phenolic and lactonic compounds. *J. Food Sci.*, **36**, 819-822.

PEARL J. A., BEYER D. L., 1951. Reaction of vanillin and its derived compounds. XI. Cinnamic acids derived from vanillin and its related compounds. *J. org. Chem.*, **16**, 219.

RIBEREAU-GAYON P., 1964. Les composés phénoliques du raisin et du vin. I. Les acides phénols. *Ann. Physiol. vég.*, **6** (2), 119-147.

STEINKE R. D., PAULSON M. C., 1964. The production of steam-volatile phenols during the cooking and alcoholic fermentation of grain. *J. agr. Food Chem.*, **12** (4), 381-387.

WALLING C., WOLFSTIRN K. B., 1947. Substituted styrenes. I. The decarboxylation of substituted cinnamic acids. *J. am. chem. Soc.*, **69**, 852-854.

WHITING G. C., CARR J. G., 1957. Chlorogenic acid metabolism in cider fermentation. *Nature*, (180), 1479.

WHITING G. C., CARR J. G., 1959. Metabolism of cinnamic acid and hydroxy-cinnamic acids by *Lactobacillus pastorianus*, var. *quinicus*. *Nature*, (184), 1427-1428.

YOKOTSUKA T., ASAO Y., SAKASAI T., 1967. Flavoring substances in shoyu. XXVII. Production of 4-ethylgaïacol during the shoyu fermentation and its role for shoyu flavor. *Nippon Nogei Kagaku Kaishi*, **41** (9), 442-447 (in *Chem. Abstr.*, **68**, 8298).

*Ann. Technol. agric.*, 1975, **24** (2), 143-170.

# ÉVOLUTION DE LA COMPOSITION GLUCIDIQUE DES GRAINS DE CÉRÉALES AU COURS DE LEUR MATURATION : MAÏS, BLÉ, ORGE

Jutta CERNING-BEROARD et A. GUILBOT

*Station de Biochimie et Physico-Chimie des Céréales, I. N. R. A., C. E. R. D. I. A., 91305 Massy*

## RÉSUMÉ

L'évolution des polyholosides (amidon, pentosanes, matières cellulosiques) et des principaux glucides éthanolo-solubles (glucose, fructose, saccharose, raffinose, glucofructosanes) a été suivie au cours de la maturation des grains de maïs, de blé et d'orge. Les échantillons de blé et d'orge ont été prélevés par intervalles de 3 à 4 jours pendant une période comprise entre 9 et 49 jours après la floraison. Les prélèvements du maïs ont été effectués tous les 7 jours pendant une période allant de 14 à 91 jours après la floraison. Les glucides ont été dosés par des méthodes spécifiques, assurant une bonne précision et reproductibilité. Les résultats sont rapportés d'une part à la substance sèche, et d'autre part à 1 000 grains. Cette dernière expression permet de distinguer les glucides qui s'accumulent progressivement dans les grains (amidon, pentosanes, matières cellulosiques) de ceux qui représentent des termes de passage (glucose, saccharose). Les résultats sont présentés en fonction d'un facteur climatique, la somme des températures moyennes journalières accumulées depuis la floraison ($\Sigma tm^oC$). Ainsi, il est possible de comparer non seulement une céréale cultivée d'une année à l'autre en un même lieu, mais aussi diverses céréales entre elles provenant de différents lieux de culture. L'allure générale de l'évolution de l'amidon est sensiblement la même pour les trois céréales. Cependant, la fin de l'accumulation de l'amidon dans le blé et dans l'orge est observée à $\Sigma tm = 600^o$ à $650^oC$, alors qu'elle se situe à $\Sigma tm = 850^o$ à $900^oC$ pour le maïs. Les pentosanes et les matières cellulosiques évoluent parallèlement à l'amidon dans le maïs. Par contre, les pentosanes du blé s'accumulent de façon analogue à l'amidon dans la variété *Joss*, alors qu'ils suivent l'évolution des matières cellulosiques dans la variété *Cappelle*. Pentosanes et matières cellulosiques s'accumulent rapidement et de façon parallèle dans le grain d'orge. Les glucides éthanolo-solubles totaux sont à leur maximum tout au début du développement des grains et ils diminuent plus ou moins progressivement pour atteindre une valeur minimale dans les grains mûrs. Les résultats font apparaître certaines phases importantes dans la formation des glucides ; les relations existantes entre le développement de ces constituants et l'hydratation des grains sont discutées.

Mots clés : *céréales, maïs, blé, orge, composition glucidique, maturation.*

## INTRODUCTION

La composition glucidique des céréales à l'état mûr a fait l'objet d'un nombre important de publications. Par contre, l'évolution des glucides au cours du développement des grains de céréales a été moins étudiée.

Les problèmes concernant la formation et la maturation du grain de maïs ont incité un certain nombre de chercheurs à poursuivre des études à ce sujet, aux environs de 1940. Ainsi, EVANS (1941) a étudié l'évolution de la composition glucidique du grain de maïs en cours de développement ; il a constaté que la teneur en amidon rapportée à la matière sèche atteint son maximum (71,0 p. 100) 22 jours après la floraison, alors que la teneur en cellulose décroît au début de la formation des grains pour vite atteindre une valeur minimale constante. Les sucres, réducteurs ou non, sont à leur maximum 15 jours après la floraison, puis diminuent régulièrement et arrivent à une valeur constante 36 jours après la floraison. L'étude d'EARLY (1951) aboutit à des résultats sensiblement analogues.

Les expériences de GRZESIUK *et al.* (1960) par contre font apparaître un accroissement lent et irrégulier de la teneur en amidon des grains de maïs, qui s'échelonne sur une période de 80 jours. Cet auteur montre par ailleurs que la teneur en pentosanes augmente au début du développement des grains, pour ensuite diminuer lentement. La teneur en hexoses atteint son maximum 16 jours après la pollinisation et décroît en cours de maturation, alors que la quantité de saccharose évolue de façon irrégulière, augmentant ou diminuant d'un prélèvement à l'autre. SHANNON (1968) a été un des premiers à mettre en évidence l'influence des conditions climatiques sur la formation de l'amidon dans le grain. JENNINGS et MCCOMBS (1969) ont indiqué que la formation de l'amidon dans les grains de maïs denté est rapide et pratiquement terminée 27 jours après la pollinisation. Leurs observations et celles d'INGLE *et al.* (1965) sur l'évolution des oses et oligosides rejoignent celles des autres auteurs.

Le laboratoire de Biochimie et Physico-chimie des Céréales de l'I. N. R. A. a entrepris en 1950 une étude sur l'évolution de la composition chimique du grain de blé au cours de la maturation. Dans ce travail, les résultats ont été rapportés au grain, ce qui a permis de donner une image plus réelle de la physiologie des grains. Rapportés à mille grains, le poids sec, l'amidon et les pentosanes évoluent suivant une courbe sigmoïde, la quantité de sucres réducteurs reste pratiquement constante. Le saccharose montre deux maximums 22 et 35 jours après la fécondation, la lévosine est à sa valeur maximale au vingt-deuxième jour (Laboratoire de Biochimie et Physicochimie des Céréales de l'I. N. R. A., 1950).

Les travaux de MENGER (1961) montrent que les glucides solubles, fructosylraffinose, maltose, glucose, fructose et saccharose sont présents dans le grain de blé dur (*Triticum durum*) dès sa formation et que seule leur concentration évolue en cours de maturation. Selon GRZESIUK (1960), le nombre et la quantité des glucides solubles ainsi que la concentration des pentosanes diminuent en fin de maturation dans les grains de blé et d'orge ; saccharose, glucodifructose et raffinose prédominent dans l'albumen, le germe contient en plus du glucose et du fructose. ROHRLICH et ESSNER (1960) trouvent que la teneur en oligosides diminue lorsque celle de l'amidon

croît, et constatent que ne subsiste en fin de maturation qu'une faible fraction de la quantité des sucres trouvée au début de la formation.

JENKINS *et al.* (1974) observent une grande fluctuation de la teneur en matière sèche et en amidon du blé, qu'ils expliquent par des variations d'activités amylasiques. Les études de l'évolution des glucides de l'orge au cours de la formation (HARRIS et McWILLIAM, 1954, 1958 ; HARRIS, 1962 ; McGREGOR *et al.*, 1971) indiquent que la quantité d'amidon rapportée au poids du grain sec augmente de façon logarithmique, et que la teneur en saccharose et en fructosanes est maximale 4 semaines après l'épiaison. HARRIS (1962) indique par ailleurs que fructose, saccharose, fructosanes et glucodifructose sont présents dans le grain dès le début de sa formation et que le raffinose n'apparaît que plus tard.

Les résultats obtenus sont parfois contradictoires et ne permettent pas toujours de considérer comme suffisantes les connaissances rassemblées à ce sujet. Les variétés des céréales étudiées et les conditions expérimentales sont souvent insuffisamment précisées, les méthodes utilisées sont rarement spécifiques. Le repérage de l'âge physiologique des grains a parfois été basé sur des observations trop subjectives. Par ailleurs, l'expression des résultats est d'une importance considérable. En effet, la seule expression des résultats par rapport à la matière sèche, en continuelle évolution, ne permet pas de suivre certains aspects de la physiologie du grain, au cours de sa formation. Ce mode d'expression peut même conduire dans certains cas à des conclusions erronées.

Un autre point concerne la présentation des résultats. Il est en effet souhaitable de rapporter les résultats en fonction de la somme des températures moyennes journalières accumulées depuis la floraison ($\Sigma$tm°C) et de prendre ainsi en considération non seulement la durée mais aussi les conditions climatiques qui influent sur la formation et le développement des plantes (GESLIN et JONARD, 1948). C'est ce qui a été fait au cours de notre étude.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### *Matériel*

Les expériences ont porté sur le maïs *INRA 260*, cultivé dans la région parisienne en 1967 et 1968, sur le blé *Cappelle* et l'orge *Iris*, tous les deux cultivés en 1967 à Clermont-Ferrand et enfin sur le blé *Joss* cultivé en 1968 dans la région parisienne.

Dans le but de définir l'âge physiologique des épis, ceux-ci ont été bagués au jour de leur floraison. Dans le cas du blé et de l'orge, au moment de chaque prélèvement, les épis sitôt coupés sont immergés dans l'azote liquide. Les deux quarts extrêmes de chaque épi, prélevés au moyen d'une écumoire, sont coupés et éliminés. La moitié médiane est battue immédiatement dans une petite batteuse monoépi d'où les grains tombent directement dans un récipient également rempli d'azote liquide.

Dans le cas du maïs, les épis récoltés ne sont soumis au traitement à l'azote liquide que 30 minutes environ après leur coupe ; seule, la partie médiane des épis est conservée.

Les échantillons sont ensuite cryodesséchés à une teneur en eau voisine de 10 p. 100, réduits au moulin Bühler, en présence de neige carbonique, en particules de taille inférieure à 0,5 mm, puis analysés.

### *Méthodes*

*Dosage de l'eau.*

La teneur en eau des grains au moment du prélèvement est déterminée dans le cas du maïs sur une rangée verticale de chacun des 4 épis, dans le cas du blé sur les grains provenant de 10 épis environ. L'étuvage est réalisé pendant 17 heures à 102°C, sur des grains broyés après

préséchage, à une teneur voisine de 15 p. 100 (C. N. E. R. N. A., 1958). Dans cette méthode, l'air de séchage, avant son entrée dans l'étuve, est ramené à des conditions d'humidité spécifique constante par refroidissement à 0°C.

*Poids de 1 000 grains.*

Une quantité suffisante de grains est divisée par dichotomies successives en 10 lots ; suivant leur taille, 100 ou 200 grains sont comptés dans chaque lot et pesés ; le poids de 1 000 grains est exprimé en substance sèche.

*Polyholosides.*

L'amidon est déterminé selon la méthode de THIVEND *et al.* (1972), et la cellulose est dosée par la méthode de WEENDE (1968), les pentosanes suivant la méthode décrite par CERNING et GUILBOT (1973 *a*).

*Oses et oligosides.*

Les glucides éthanolo-solubles totaux, après deux extractions à chaud suivies de deux lavages à froid (CERNING, 1970) sont dosés par la méthode à l'anthrone (LOEWUS, 1952). Fructose et fructosanes sont déterminés par la méthode à l'anthrone à 50°C (JOHNSON *et al.*, 1964 ; CERNING, 1970). Glucose, saccharose et raffinose sont estimés par voie enzymatique (CERNING, 1970 ; CERNING-BEROARD, 1975).

## RÉSULTATS

### ÉVOLUTION DE LA TENEUR (p. 100 MS) EN CONSTITUANTS GLUCIDIQUES DU MAÏS, DE L'ORGE ET DU BLÉ

### *Maïs*

L'évolution de la composition en polyholosides, rapportée à la substance sèche, des échantillons de maïs de 1967 et de 1968 est rapportée dans le tableau 1, celle des oses et oligosides dans le tableau 2.

TABLEAU 1

*Maïs* INRA 260

*Composition en polyholosides exprimée en p. 100 de la substance sèche*

| Prélèvements | Nombre de jours après la floraison | | Amidon | | Pentosanes | | Cellulose | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1967 | 1968 | 1967 | 1968 | 1967 | 1968 | 1967 | 1968 |
| 1 | 14 | 14 | 20,55 | 6,10 | 7,16 | 10,28 | 2,47 | 5,20 |
| 2 | 21 | 21 | 46,80 | 34,65 | 5,71 | 6,81 | 2,26 | 3,20 |
| 3 | 28 | 28 | 52,95 | 56,80 | 4,00 | 5,45 | 2,05 | 2,48 |
| 4 | 35 | 35 | 57,95 | 57,50 | 4,60 | 5,08 | 1,85 | 1,97 |
| 5 | 42 | 42 | 58,75 | 60,00 | 4,34 | 4,08 | 1,65 | 1,74 |
| 6 | 49 | 49 | 57,95 | 62,20 | 3,94 | 4,13 | 1,71 | 1,85 |
| 7 | 56 | 56 | 60,75 | 64,40 | 3,73 | 4,11 | 1,76 | 1,78 |
| 8 | 63 | 63 | 64,40 | 60,85 | 3,90 | 4,44 | 1,57 | 2,04 |
| 9 | 70 | 70 | 71,70 | 66,50 | 4,55 | 4,72 | 1,55 | 2,06 |
| 10 | 77 | 77 | 72,80 | 67,65 | 4,10 | 4,71 | 1,61 | 1,89 |
| 11 | 84 | 84 | 71,50 | 69,40 | 4,42 | 4,39 | 1,82 | 1,61 |
| 12 | 91 | 88 | 71,35 | 71,10 | 3,84 | 4,49 | 1,71 | 1,80 |

TABLEAU 2

*Maïs* INRA 260

*Composition en oses et oligosides exprimée en p. 100 de la substance sèche*

| Prélè-vements | Nombre de jours après la floraison | | Glucides éthanolo-solubles totaux | | Glucose | | Fructose | | Saccharose | | Raffinose | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | 1967 | 1968 | 1967 | 1968 | 1967 | 1968 | 1967 | 1968 | 1967 | 1968 | 1967 | 1968 |
| 1 | 14 | 14 | 40,43 | 40,65 | 11,10 | 13,05 | 6,07 | 11,18 | 19,10 | 10,40 | 0 | 0 |
| 2 | 21 | 21 | 16,61 | 25,75 | 6,54 | 7,93 | 6,22 | 6,36 | 1,54 | 8,10 | 0 | 0 |
| 3 | 28 | 28 | 10,40 | 14,50 | 4,02 | 4,40 | 4,07 | 1,86 | 2,12 | 8,75 | 0 | 0 |
| 4 | 35 | 35 | 10,49 | 11,90 | 1,82 | 1,25 | 2,14 | 1,20 | 4,47 | 7,30 | 0 | 0 |
| 5 | 42 | 42 | 7,34 | 9,74 | 0,88 | 1,37 | 2,64 | 2,31 | 3,30 | 4,95 | 0 | 0 |
| 6 | 49 | 49 | 6,31 | 7,65 | 0,63 | 0,85 | 0,60 | 1,31 | 4,55 | 5,29 | 0 | 0 |
| 7 | 56 | 56 | 4,87 | 5,45 | 0,41 | 0,44 | 0,52 | 1,10 | 3,49 | 3,84 | 0 | 0 |
| 8 | 63 | 63 | 3,44 | 5,40 | 0,15 | 0,27 | 0,21 | 0,45 | 2,86 | 3,54 | 0,05 | 0,12 |
| 9 | 70 | 70 | 3,57 | 5,50 | 0,11 | 0,26 | 0,37 | 0,38 | 2,34 | 3,97 | 0,12 | 0,15 |
| 10 | 77 | 77 | 1,81 | 4,20 | 0,05 | 0,12 | 0,24 | 0,40 | 1,19 | 2,78 | 0,20 | 0,20 |
| 11 | 84 | 84 | 1,39 | 3,10 | 0,02 | 0,11 | 0,14 | 0,41 | 0,89 | 1,86 | 0,23 | 0,28 |
| 12 | 91 | 91 | 1,44 | 2,25 | 0 | 0,03 | 0,18 | 0,26 | 0,72 | 1,25 | 0,23 | 0,31 |

*Polyholosides.*

Considérées globalement, les vitesses de formation de l'amidon au cours de la maturation du grain de maïs en 1967 et 1968 sont semblables, la teneur en amidon augmente rapidement dans une première phase, plus lentement dans la dernière. Cependant, on constate que l'amidon est synthétisé plus rapidement en 1967 qu'en 1968, jusqu'au vingt et unième jour après la floraison et que le phénomène est inversé les 5 semaines suivantes.

La teneur maximale en amidon est atteinte après 77 jours en 1967 (72,8 p. 100 MS) et après 88 jours en 1968 (71,1 p. 100 MS).

Les teneurs en pentosanes des deux maïs sont différentes surtout au début de la formation des grains ; le maïs récolté en 1968 en contient plus que celui de 1967 entre le quatorzième et le trente-cinquième jour après la floraison. Dans la période ultérieure, la teneur est sensiblement la même dans les deux cas.

Sauf pour le grain très jeune, les différences des teneurs en cellulose sont faibles, tout au long de la formation des grains.

*Oses et oligosides.*

Les évolutions de la teneur en glucides éthanolo-solubles totaux, tout comme celles des oses et oligosides constituant cette fraction (tabl. 2), se ressemblent d'une année à l'autre. Les teneurs en oses et oligosides diminuent brutalement de 40 à 10 p. 100 SS entre le quatorzième et le trente-cinquième jour. Cette diminution se poursuit ensuite mais de façon plus lente et semble-t-il par étapes successives. Le maïs de 1968 contient à maturité plus de glucides éthanolo-solubles que celui de 1967 (respectivement 2,25 et 1,44 p. 100). Il est intéressant de noter que le raffinose est absent dans le grain jusqu'au cinquante-sixième jour après la floraison ; ensuite sa teneur augmente lentement et atteint son maximum dans le grain mûr.

### *Blé et orge*

Les résultats relatifs à l'évolution des polyholosides, des oses et des oligosides dans les blés *Cappelle* et *Joss* et dans l'orge *Iris* sont rassemblés respectivement dans les tableaux 3, 4 et 5.

*Polyholosides.*

L'évolution de la teneur en amidon du blé et de l'orge présente la même allure générale : augmentation rapide jusqu'à la troisième semaine après la floraison, puis ralentissement et stabilisation.

Remarquons toutefois que la teneur en amidon de *Cappelle* (tabl. 3) s'accroît plus rapidement d'abord et plus lentement ensuite que celle de *Joss* (tabl. 4). A maturité, les teneurs en amidon de *Joss* (67,2 p. 100) et de *Cappelle* (68,4 p. 100) sont sensiblement les mêmes et l'orge est la céréale la plus pauvre en amidon (60,2 p. 100).

La teneur en pentosanes des deux blés et de l'orge évolue de façon différente. Si l'on constate de faibles fluctuations seulement dans le blé *Joss* (tabl. 4), la quantité de pentosanes dans le blé *Cappelle* (tabl. 3) croît au début pour diminuer ensuite. Les teneurs en pentosanes de l'orge (tabl. 5) augmentent en deux étapes et diminuent à partir du vingt-huitième jour après la floraison. La teneur en cellulose des

TABLEAU 3

*Blé* Cappelle, *1967*

*Composition glucidique exprimée en p. 100 de la substance sèche*

| Prélè-vements | Nbre de jours après la floraison | Poids de 1 000 grains secs | Amidon | Pentosanes | Cellulose | Glucides éthanolo-solubles totaux | Glucose | Saccharose | Raffinose | Fructosanes Fructose | Fraction « X » (¹) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 8 | 3,9 | 23,45 | 5,32 | 2,76 | 45,20 | 3,88 | 8,02 | 0 | 25,28 | 8,02 |
| 2 | 12 | 9,2 | 34,20 | 7,26 | 2,49 | 37,60 | 1,78 | 12,18 | 0 | 14,22 | 9,42 |
| 3 | 15 | 17,2 | 43,55 | 7,48 | 2,59 | 18,70 | 0,72 | 6,65 | 0 | 5,75 | 5,58 |
| 4 | 19 | 20,6 | 53,20 | 7,82 | 1,88 | 12,16 | 0,79 | 4,54 | 0 | 5,41 | 1,42 |
| 5 | 21 | 27,0 | 65,85 | 6,81 | 1,50 | 7,78 | 0,37 | 3,96 | 0 | 3,00 | 0,45 |
| 6 | 24 | 32,4 | 63,80 | 6,62 | 1,52 | 6,44 | 0,24 | 2,77 | 0 | 2,10 | 1,33 |
| 7 | 27 | 37,6 | 64,60 | 6,04 | 2,14 | 5,06 | 0,12 | 3,08 | 0 | 1,04 | 0,82 |
| 8 | 31 | 42,8 | 67,10 | 6,10 | 1,85 | 4,58 | 0,05 | 2,32 | 0,07 | 1,38 | 0,76 |
| 9 | 34 | 43,8 | 68,50 | 5,74 | 1,71 | 3,54 | 0,02 | 1,74 | 0,23 | 0,94 | 0,61 |
| 10 | 38 | 43,1 | 66,35 | 5,94 | 1,63 | 2,95 | 0,02 | 1,64 | 0,31 | 0,92 | 0,06 |
| 11 | 42 | 42,5 | 68,40 | 5,74 | 1,80 | 3,23 | 0 | 1,55 | 0,35 | 0,94 | 0,39 |

(¹) Fraction obtenue par calcul : glucides éthanolo-solubles totaux — (glucose + saccharose + raffinose + fructose + fructosanes).

TABLEAU 4

*Blé* Joss, *1968*

*Composition glucidique exprimée en p. 100 de la substance sèche*

| Prélèvements | Nbre de jours après la floraison | Poids de 1 000 grains secs | Amidon | Pentosanes | Cellulose | Glucides éthanolo-solubles totaux | Glucose | Saccharose | Raffinose | Fructosanes Fructose | Fraction « X » (1) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 15 | 6,26 | 19,1 | 6,40 | 2,97 | 46,20 | 5,56 | 5,06 | 0 | 28,93 | 6,65 |
| 2 | 19 | 11,80 | 35,1 | 6,24 | 2,98 | 25,80 | 1,25 | 8,83 | 0 | 14,67 | 1,05 |
| 3 | 22 | 16,60 | 52,1 | 6,34 | 2,77 | 15,50 | 0,30 | 7,10 | 0 | 6,71 | 1,39 |
| 4 | 26 | 22,75 | 60,8 | 6,60 | 2,75 | 8,75 | 0,89 | 3,93 | 0 | 4,05 | 0 |
| 5 | 29 | 29,20 | 65,5 | 6,95 | 2,20 | 5,80 | 0,09 | 2,71 | 0 | 2,31 | 0,69 |
| 6 | 33 | 33,35 | 65,6 | 6,60 | 2,70 | 5,00 | 0,08 | 2,50 | 0 | 2,40 | 0,02 |
| 7 | 36 | 35,25 | 65,8 | 6,92 | 2,11 | 4,57 | 0,08 | 2,17 | traces | 1,72 | 0,60 |
| 8 | 40 | 38,95 | 67,3 | 6,80 | 1,57 | 3,84 | 0,02 | 2,15 | 0,03 | 1,57 | 0,07 |
| 9 | 43 | 40,80 | 67,9 | 6,50 | 1,46 | 3,65 | 0,04 | 1,68 | 0,12 | 1,22 | 0,60 |
| 10 | 47 | 41,00 | 67,2 | 7,05 | 1,91 | 2,87 | 0,04 | 1,40 | 0,20 | 1,14 | 0,09 |

(1) Fraction obtenue par calcul : glucides éthanolo-solubles totaux — (glucose + saccharose + raffinose + fructose + fructosanes).

TABLEAU 5

*Orge* Iris, *1967*

*Composition glucidique exprimée en p. 100 de la substance sèche*

| Prélèvements | Nbre de jours après la floraison | Poids de 1 000 grains secs | Amidon | Pentosanes | Cellulose | Glucides éthanolo-solubles totaux | Glucose | Saccharose | Raffinose | Fructosanes Fructose | Fraction « X » [1] |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 1 | 9 | 4,50 | 13,20 | 3,63 | 1,32 | 63,95 | 1,90 | 16,60 | 0 | 22,10 | 23,35 |
| 2 | 12 | 7,00 | 27,30 | 3,78 | 1,18 | 43,05 | 0,39 | 14,10 | 0 | 9,60 | 18,96 |
| 3 | 15 | 9,30 | 40,10 | 3,81 | 1,17 | 29,60 | 0,35 | 9,27 | 0 | 13,33 | 6,65 |
| 4 | 18 | 17,55 | 43,20 | 8,63 | 7,81 | 14,20 | 0,16 | 5,04 | 0 | 5,53 | 3,47 |
| 5 | 21 | 19,75 | 47,90 | 8,24 | 7,05 | 8,94 | 0,16 | 3,62 | 0 | 3,96 | 1,20 |
| 6 | 24 | 24,55 | 49,60 | 10,10 | 5,06 | 7,10 | 0,19 | 3,22 | 0 | 2,36 | 1,33 |
| 7 | 28 | 29,85 | 57,00 | 8,14 | 4,93 | 4,62 | 0,06 | 2,85 | 0 | 0,65 | 1,06 |
| 8 | 32 | 34,50 | 57,50 | 7,28 | 4,30 | 4,90 | 0,07 | 2,54 | 0,08 | 1,00 | 1,21 |
| 9 | 38 | 36,70 | 59,60 | 7,09 | 3,77 | 2,97 | 0,02 | 0,98 | 0,20 | 0,62 | 1,15 |
| 10 | 44 | 36,90 | 58,90 | 7,12 | 3,83 | 2,55 | 0,01 | 0,72 | 0,25 | 1,17 | 0,40 |
| 11 | 49 | 37,80 | 60,20 | 6,15 | 4,10 | 2,70 | 0,02 | 0,74 | 0,28 | 1,10 | 0,56 |

[1] Fraction obtenue par calcul : glucides éthanolo-solubles totaux — (glucose + saccharose + raffinose + fructose + fructosanes).

deux blés (tabl. 3 et 4) décroît lentement, pour tendre vers une valeur constante ; on constate toutefois une légère augmentation au vingt-septième jour dans *Cappelle* et au trente-troisième dans *Joss*. L'orge (tabl. 5) par contre montre une évolution différente ; sa teneur en cellulose est plus faible au début que celle des blés. A partir du quinzième jour, elle augmente considérablement, croissance qui coïncide d'ailleurs avec celle des pentosanes, pour ensuite diminuer rapidement et tendre par étapes vers une valeur constante, supérieure à celle des blés.

*Oses et oligosides.*

La teneur en glucides éthanolo-solubles, tout comme celle des oses et oligosides (glucose, saccharose, raffinose, fructose et fructosanes, et fraction « X » dont nous discuterons plus loin) qui constituent cette fraction, évolue de façon semblable dans les deux blés et dans l'orge (tabl. 3 et 5). Tous ces constituants, sauf le raffinose, sont présents en quantités importantes dans le grain jeune, et ont tendance à diminuer plus ou moins rapidement pour arriver à leur valeur minimale dans le grain mûr. L'apparition du raffinose ne se manifeste que dans la dernière phase de la formation des grains de blé et d'orge, à un stade où les autres oses et oligosides ne montrent pratiquement plus d'évolution.

Il convient ici de faire une remarque sur la fraction « X ». Si on compare les chiffres des teneurs en glucides éthanolo-solubles totaux dosés à l'anthrone et la somme des sucres dosés individuellement, on obtient des valeurs sensiblement identiques dans le cas du maïs, alors que, pour le blé et l'orge, la quantité obtenue par dosage à l'anthrone est supérieure à la valeur calculée. Cette différence est d'autant plus grande que les grains sont plus jeunes ; il n'a pas été possible jusqu'à présent de préciser la nature de cette fraction « X ». Compte tenu de ce qui a été dosé séparément — glucose, fructose, fructosanes, saccharose, raffinose —, on peut supposer qu'il s'agit de glucanes, qui seraient présents en quantité importante au début de la formation des grains (tabl. 3, 4, 5). Cette hypothèse paraît vraisemblable, car l'orge, connue pour contenir à l'état mûr une quantité notable de glucanes, présente la plus forte proportion de fraction « X ».

## COMPARAISON DE L'ÉVOLUTION DE LA QUANTITÉ DE MATIÈRE SÈCHE ET DE L'EAU PRÉSENTE DANS 1 000 GRAINS DE MAÏS ET DE BLÉ

Avant de comparer l'évolution de chaque constituant glucidique dans les différentes céréales, nous allons d'abord examiner comment évoluent deux caractéristiques des grains qui, selon GESLIN et JONARD (1948), paraissent marquer des étapes importantes au cours de la maturation : le poids sec des grains et l'eau qu'ils renferment. Tous les résultats sont exprimés en fonction de la somme des températures moyennes journalières accumulées depuis la floraison (GESLIN et JONARD, 1948), $\Sigma$tm°C. La relation existant entre les jours écoulés depuis la floraison et $\Sigma$tm°C est illustrée dans la figure 1.

La figure 2 représente l'évolution du poids sec de 1 000 grains (1), de l'eau (2) en fonction de $\Sigma$tm°C, et de la teneur en eau des grains au moment du prélèvement (3). L'évolution du poids sec de 1 000 grains se traduit en une courbe de croissance typique dans le cas du maïs et du blé, montrant un palier vers la fin de la maturation.

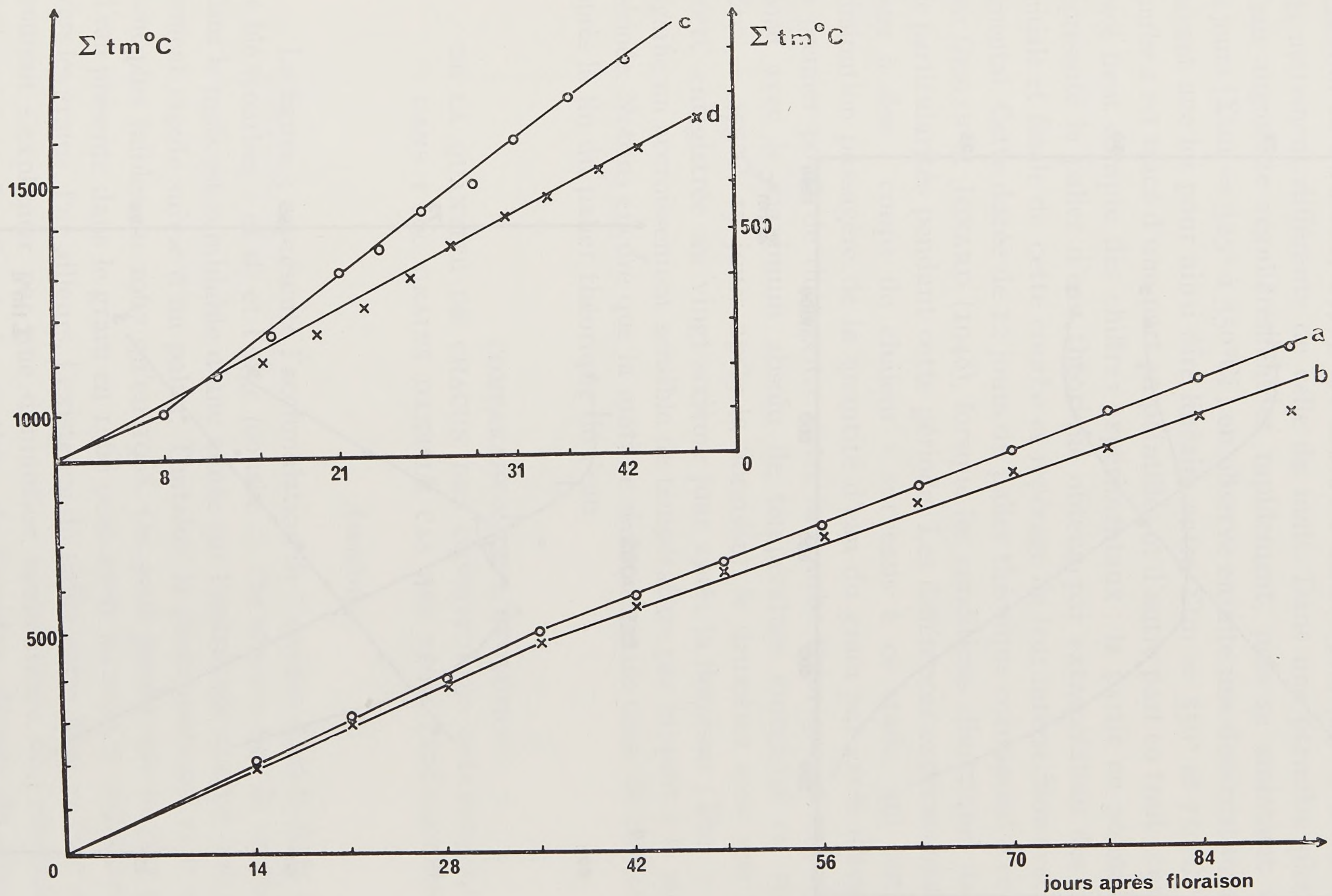



FIG. 1. — *Somme des températures moyennes journalières accumulées depuis la floraison* (Σtm°C) *en fonction du temps écoulé à partir de celle-ci*

a : maïs *INRA 260*, 1967
b : maïs *INRA 260*, 1968
c : blé *Cappelle*, 1967
d : blé *Joss*, 1968

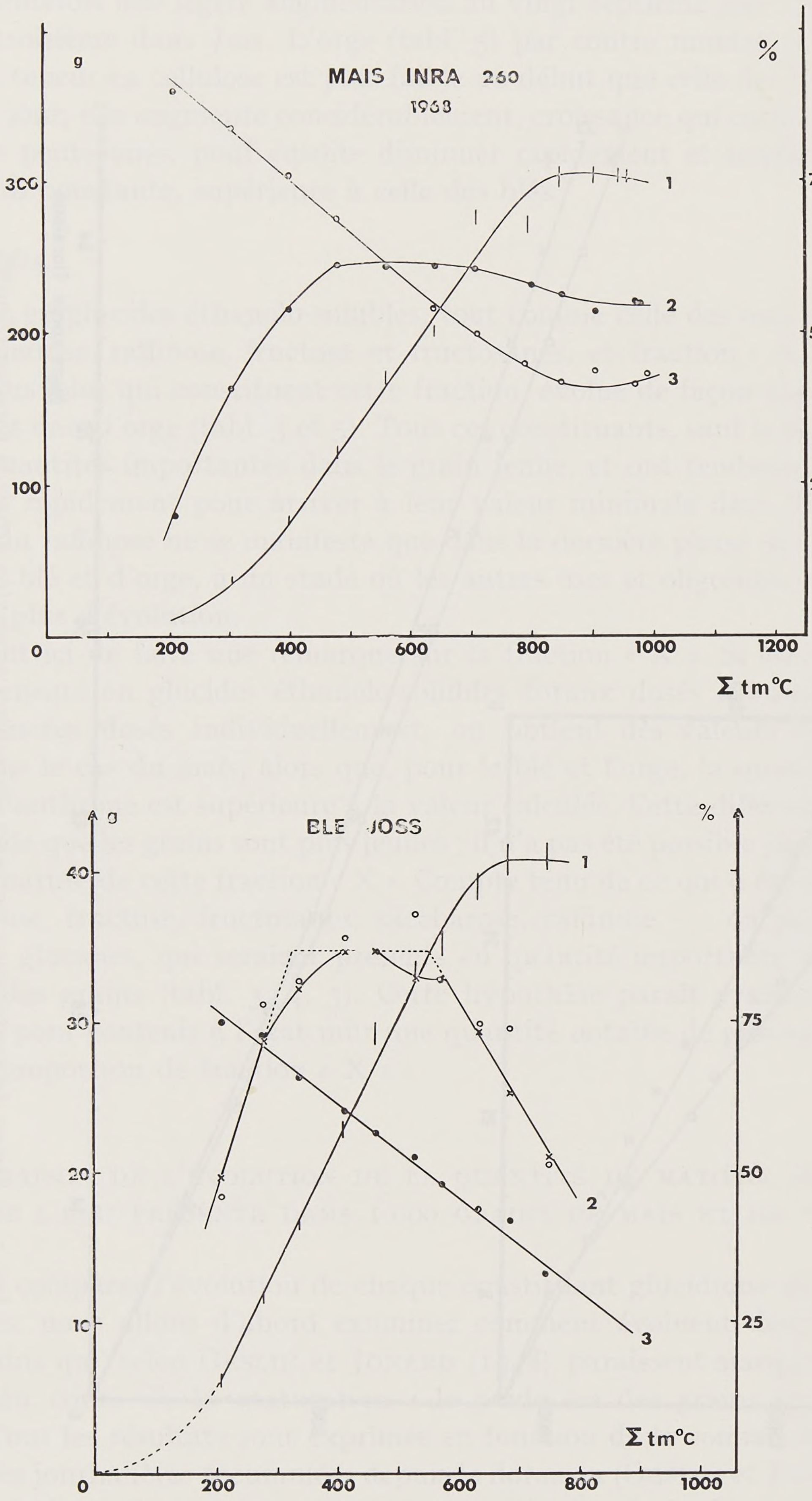



Fig. 2. — *Évolution de la matière sèche* (1), *de l'eau* (2) *exprimée en grammes pour 1 000 grains et de la teneur en eau des grains au moment du prélèvement* (3), *en fonction de* $\Sigma tm°C$

Ordonnée gauche : g/1 000 grains
Ordonnée droite : teneur en eau en p. 100

La quantité d'eau dans le grain de maïs (courbe 2) augmente assez vite et régulièrement entre $\Sigma tm = 240^{o}$ et $500^{o}C$ ; elle se maintient pratiquement constante pendant 34 jours ($\Sigma tm = 565^{o}$ à $950^{o}C$) puis décroît très lentement dans la phase ultérieure. Ce palier a une durée plus longue (41 jours) dans le maïs cultivé en 1967 (CERNING et GUILBOT, 1971). La courbe 2 du blé *Joss* (fig. 2) montre une évolution très nettement différente de celle du maïs. Dans une première phase, la quantité d'eau augmente régulièrement et rapidement, puis se maintient stable pendant 12 jours ($\Sigma tm = 325^{o}$ à $550^{o}C$) ; on observe ensuite une dessiccation rapide du grain suivant une loi pour ainsi dire linéaire entre $\Sigma tm = 550^{o}$ et $750^{o}C$. Le palier de la courbe 2 est tracé d'une part en pointillés et d'autre part en trait continu ; ce dernier tracé tient compte des chiffres expérimentaux ; la partie en pointillés, par contre, représente le palier d'eau théorique obtenu par extrapolation des parties linéaires initiale et finale de cette courbe et repérage de leur intersection avec le plateau expérimental. Cette durée de 12 jours du palier théorique correspond à ce qui est observé par GESLIN et JONARD (1948), lorsque les conditions climatiques ne présentent pas de particularités pendant cette période. Les différences expérimentales sont à attribuer à des « coups de chaleur » survenus à ce stade, qui ont provoqué une diminution passagère de la quantité d'eau du grain par excès d'évaporation. Ainsi le premier point de divergence entre la courbe théorique et expérimentale correspond avec le maximum absolu de température enregistré en 1968 ($33^{o}C$, vers $\Sigma tm = 275^{o}C$, 17 jours après la floraison), le deuxième avec une température de $26^{o}1C$ enregistrée au vingt-sixième jour après la floraison ($\Sigma tm = 405^{o}C$), ce qui signifie un accroissement sensible de température par rapport à la moyenne de cette période. Notons encore que la matière sèche du grain cesse de croître quelques jours après la fin du palier théorique de l'eau.

## COMPARAISON DE L'ÉVOLUTION DE LA QUANTITÉ DE CHACUN DES CONSTITUANTS GLUCIDIQUES PRÉSENTS DANS 1 000 GRAINS DANS LE CAS DES TROIS CÉRÉALES ÉTUDIÉES

### *Amidon*

La figure 3 représente l'accumulation de l'amidon dans le maïs (courbes *a* et *b*), le blé (courbes *c* et *d*) et l'orge (courbe *e*). On observe que la synthèse de l'amidon dans le maïs est semblable d'une année sur l'autre, elle montre une phase d'accroissement rapide suivie d'un palier. Toutefois la pente moyenne et le niveau du palier sont plus faibles en 1967 qu'en 1968. On peut penser que la plus grande quantité d'eau présente dans le grain en 1968 peut avoir favorisé la migration des substances vers les grains. Par ailleurs, l'existence du palier entre $\Sigma tm = 850^{o}$ et $950^{o}C$ en 1968 pourrait s'expliquer par une diminution momentanée de l'ensoleillement pendant cette période. La fin de la synthèse de l'amidon, décalée de $\Sigma tm = 50^{o}C$ d'une année sur l'autre, correspond au soixante-dixième jour après la floraison, soit 7 jours après la fin du palier de l'eau.

Les courbes relatives à l'évolution de l'amidon dans les deux blés (*c*, *d*) et l'orge (*e*) ont la même allure sigmoïde. Dans le blé *Joss* (*d*), nous notons cependant un très léger ralentissement de l'accumulation de l'amidon entre $\Sigma tm = 475^{o}$ et $620^{o}C$ ; ceci peut s'expliquer par le fait que ce blé semble avoir subi un début d'échaudage

par coup de chaleur au niveau du palier de l'eau. Quels que soient l'année, le lieu de culture et la céréale considérée (blé, orge), la fin de l'accumulation de l'amidon se situe toujours entre Σtm = 600° et 650°C, alors que le nombre de jours écoulés depuis la floraison varie entre 31 et 42 jours.

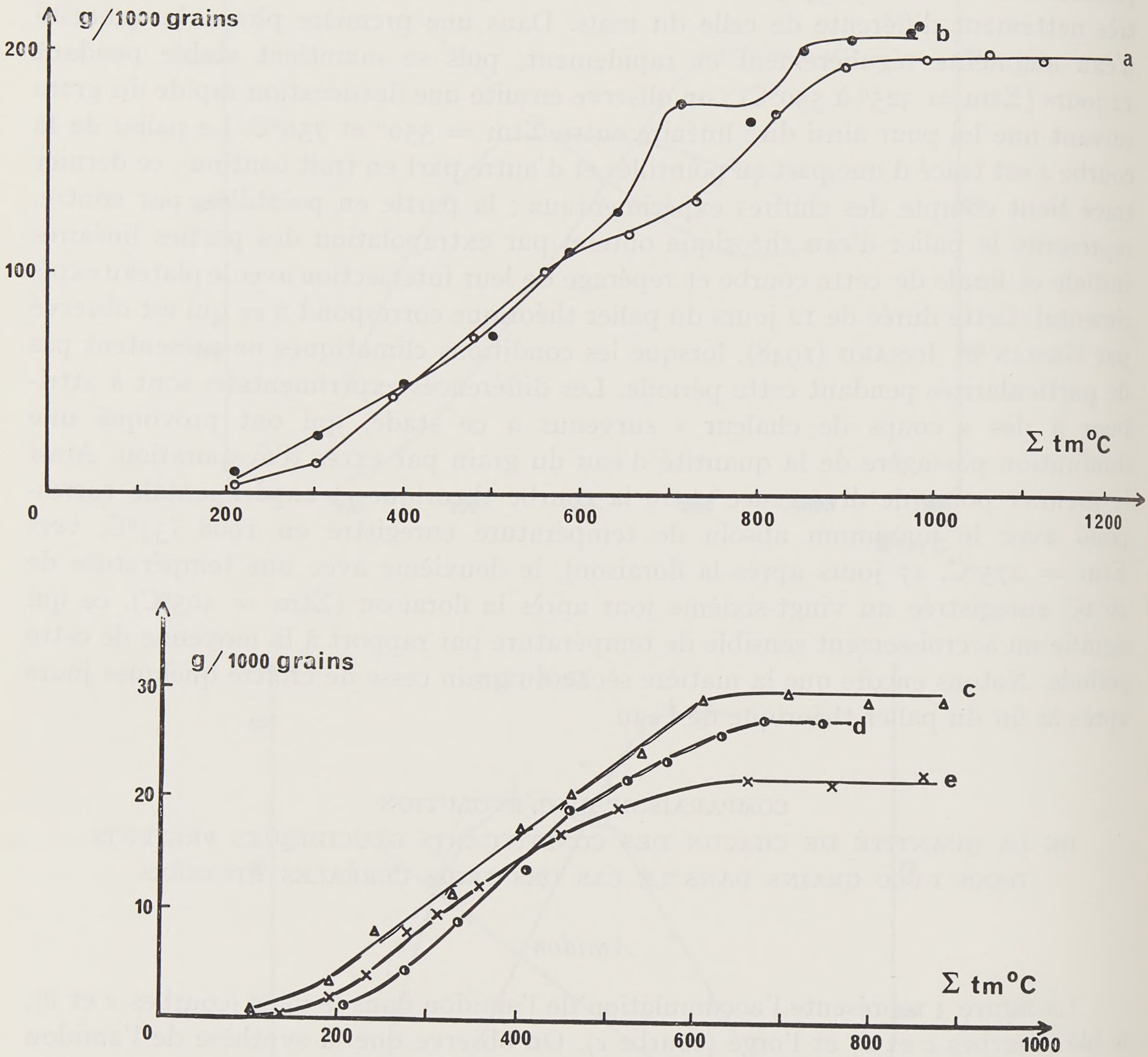



FIG. 3. — *Évolution de la quantité d'amidon, exprimée en grammes pour 1 000 grains, en fonction de Σtm°C*

a : maïs *INRA 260*, 1967
b : maïs *INRA 260*, 1968
c : blé *Cappelle*
d : blé *Joss*
e : orge *Iris*

## *Pentosanes*

Nous retrouvons sur la figure 4 une certaine ressemblance entre les deux courbes qui représentent l'accumulation des pentosanes dans les grains de maïs de 1967 (*a*) et 1968 (*b*) ; l'évolution est légèrement plus lente en 1967 dans la première phase. La synthèse ralentit fortement entre Σtm = 850° et 925°C, comme nous avons pu déjà le constater pour l'amidon. Le stade auquel est atteint la quantité

maximale de pentosanes se situe pour les deux années 70 jours après la floraison, soit 7 jours après la fin du palier de l'eau.

Les courbes qui illustrent l'accumulation des pentosanes dans les deux blés (*c*, *d*) et l'orge (*e*) sont différentes. Le blé *Joss* (*d*) montre une croissance régulière, tandis que le blé *Cappelle* (*c*) présente un accroissement rapide et bref, suivi d'une longue période d'accumulation avant d'arriver à un palier. Enfin le début de l'évolution des pentosanes dans l'orge (*e*) ressemble un peu à celui du *Cappelle*, et après un ralentissement on remarque un nouvel accroissement rapide, le maximum étant très vite atteint dans cette céréale.

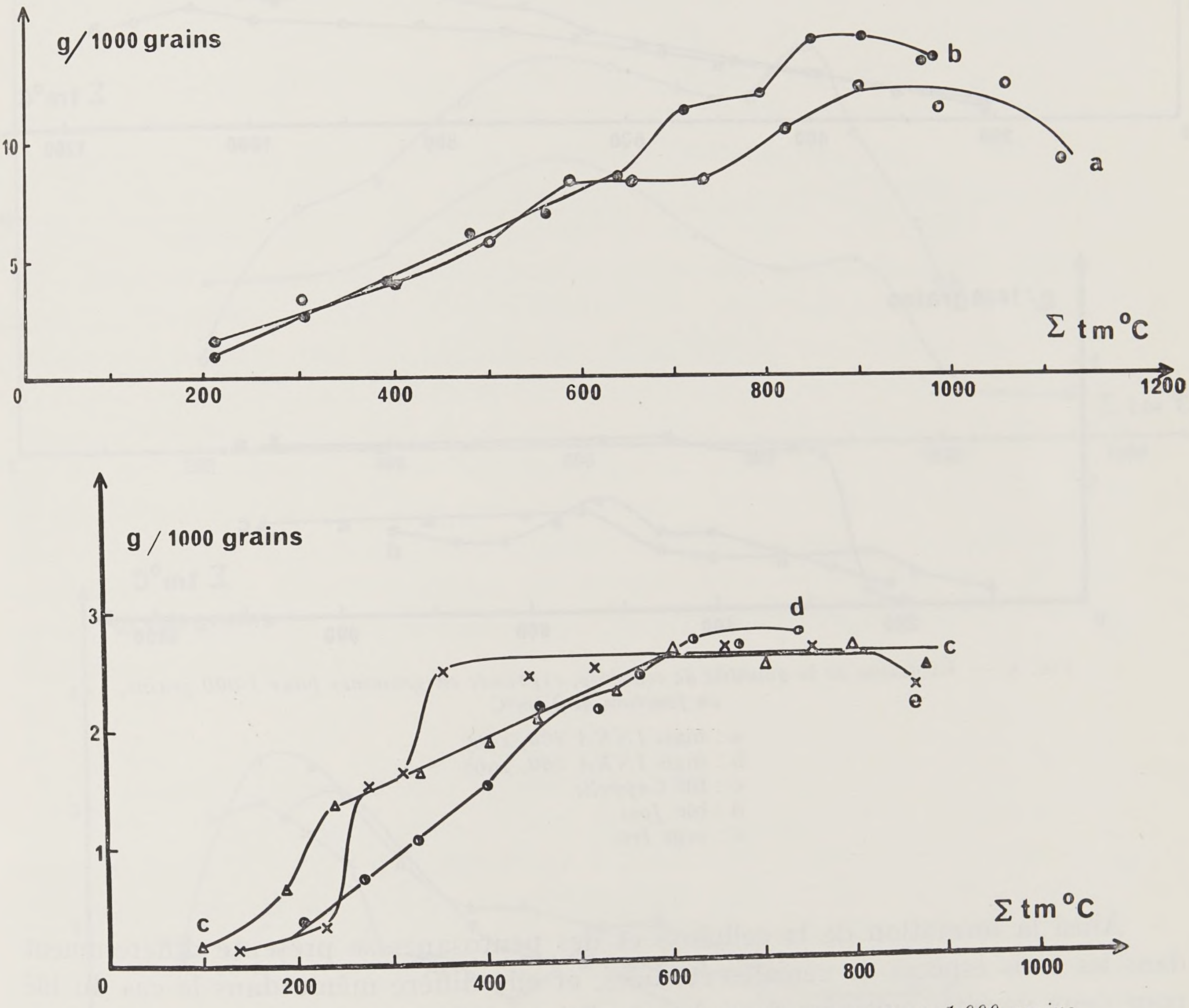



FIG. 4. — *Évolution de la quantité de pentosanes, exprimée en grammes pour 1 000 grains, en fonction de* $\Sigma tm°C$

a : maïs *INRA*, 1967
b : maïs *INRA*, 1968
c : blé *Cappelle*
d : blé *Joss*
e : orge *Iris*

*Cellulose*

La synthèse de la cellulose dans les maïs 1967 et 1968 est assez comparable (fig. 5). Dans la toute dernière phase, la quantité de cellulose diminue légèrement dans les deux cas.

Dans le blé *Joss* (*d*), on observe, après une croissance régulière, un ralentissement au niveau du palier de l'eau ($\Sigma$tm = 325° à 555°C) suivi d'abord d'un maximum avant d'atteindre le palier final. La cellulose semble s'accumuler en deux étapes dans le blé *Cappelle* (*c*). Dans l'orge (*e*), on retrouve ces deux étapes, mais avec une accumulation beaucoup plus marquée au début de la formation des grains.

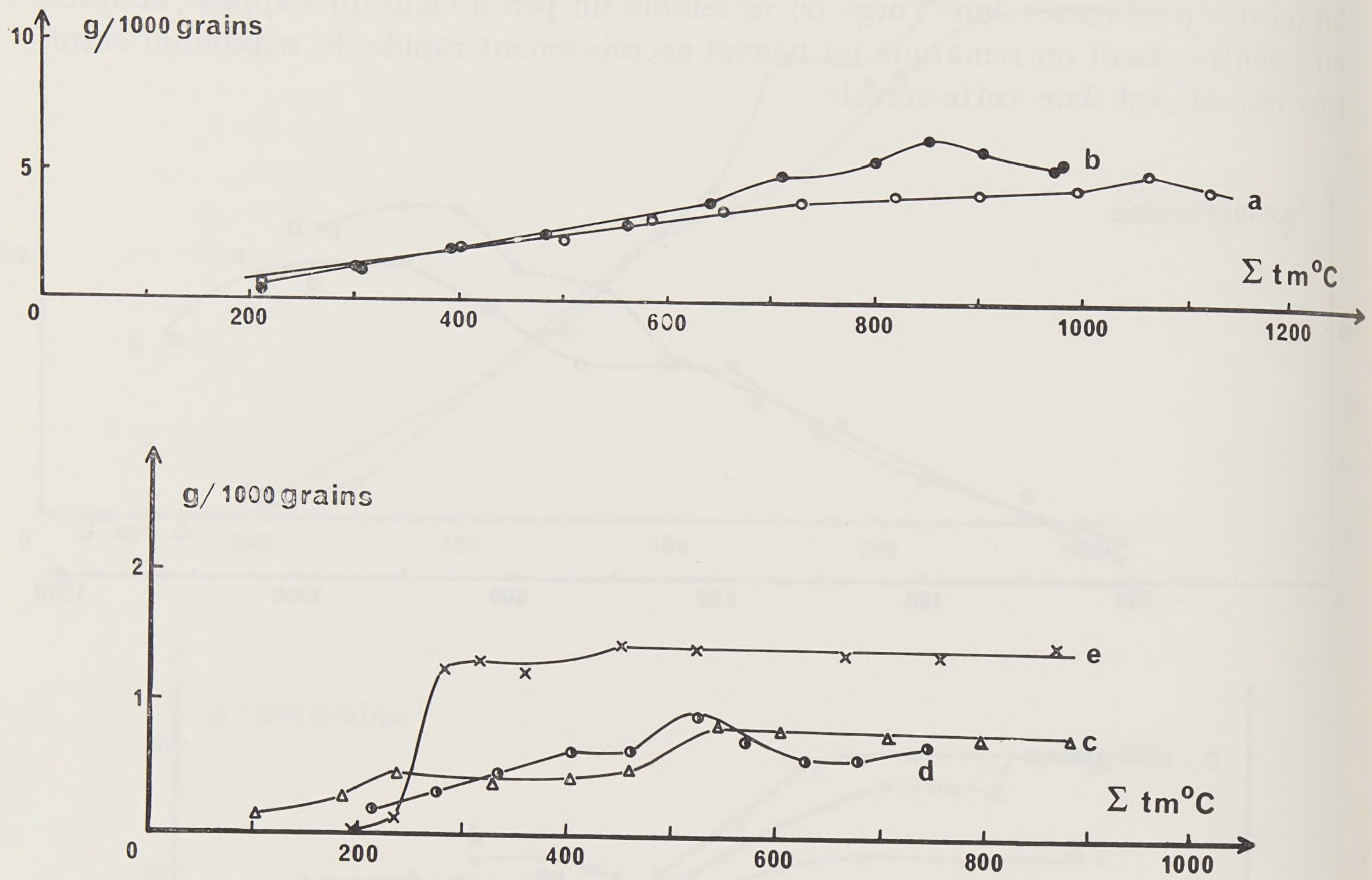



FIG. 5. — *Évolution de la quantité de cellulose, exprimée en grammes pour 1 000 grains, en fonction de* $\Sigma$*tm*°C

a : maïs *INRA 260*, 1967
b : maïs *INRA 260*, 1968
c : blé *Cappelle*
d : blé *Joss*
e : orge *Iris*

Ainsi la formation de la cellulose et des pentosanes se présente différemment dans les trois espèces de céréales étudiées, et elle diffère même dans le cas du blé pour deux variétés cultivées dans des conditions différentes.

### *Glucides éthanolo-solubles totaux*

L'évolution des glucides éthanolo-solubles totaux se présente (fig. 6) comme une série d'accumulations rapides, séparées par des zones où, soit la quantité de ces constituants s'accroît lentement, soit passe par un minimum. L'évolution observée pour le maïs (*a*, *b*) au cours des deux années se ressemble avec un certain décalage des maximums. Comme nous avons pu déjà le constater pour les autres constituants, le maïs 1968 est plus riche en glucides éthanolo-solubles totaux que celui de 1967.

L'évolution des glucides éthanolo-solubles dans les grains de blé (*c*, *d*) et d'orge

(*e*) présente un aspect bien différent de celui observé dans le maïs. Dans tous les cas, on remarque un maximum au début, qui est suivi d'une diminution rapide avant de noter un palier plus ou moins marqué. Quelles que soient la céréale et l'année, on note le premier maximum toujours aux environs des valeurs $\Sigma tm = 200°$ à $250°C$.

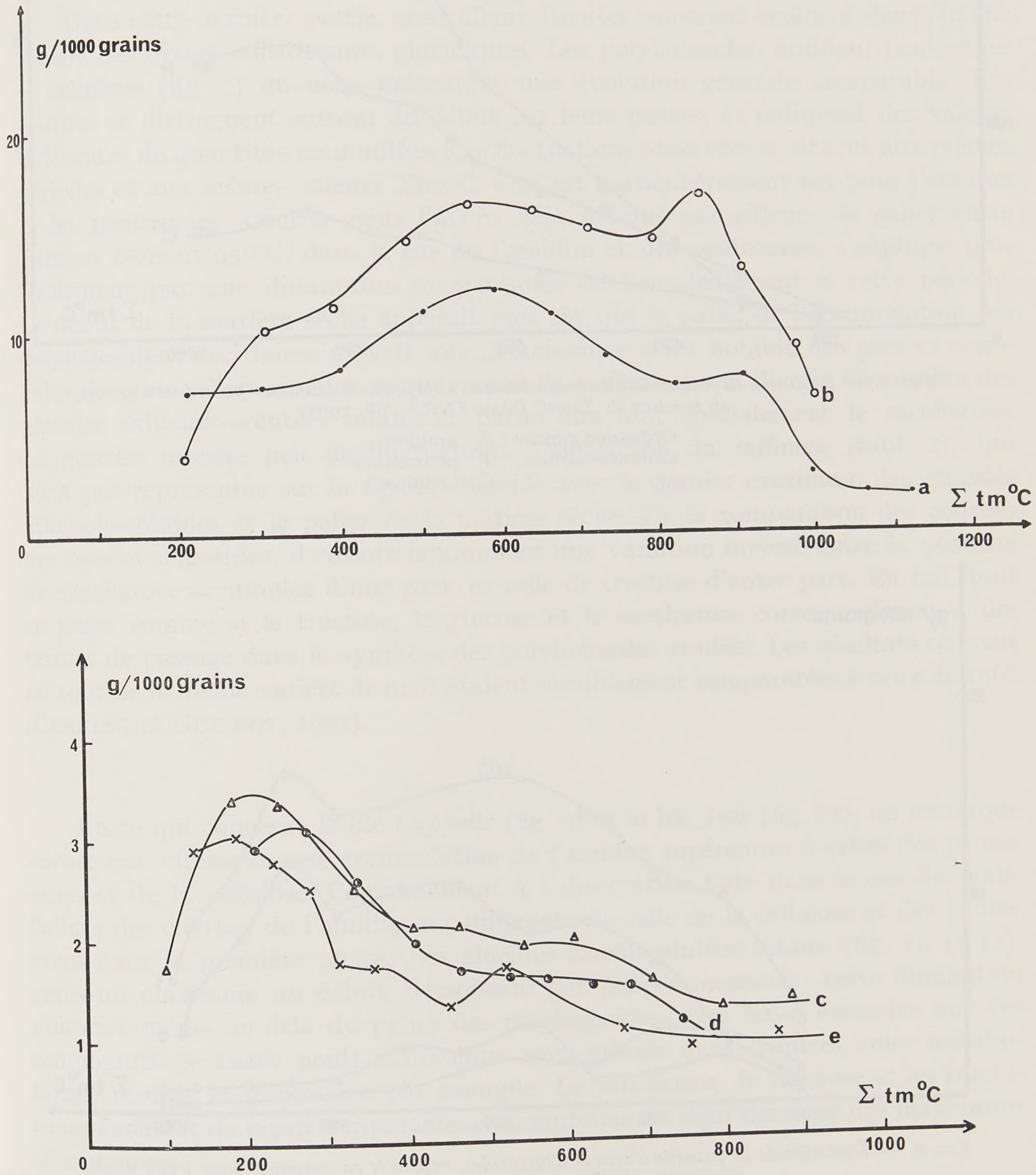



FIG. 6. — *Évolution de la quantité de glucides éthanolo-solubles totaux, exprimée en grammes pour 1 000 grains en fonction de* $\Sigma tm°C$

a : maïs *INRA 260*, 1967
b : maïs *INRA 260*, 1968
c : blé *Cappelle*
d : blé *Joss*
e : orge *Iris*

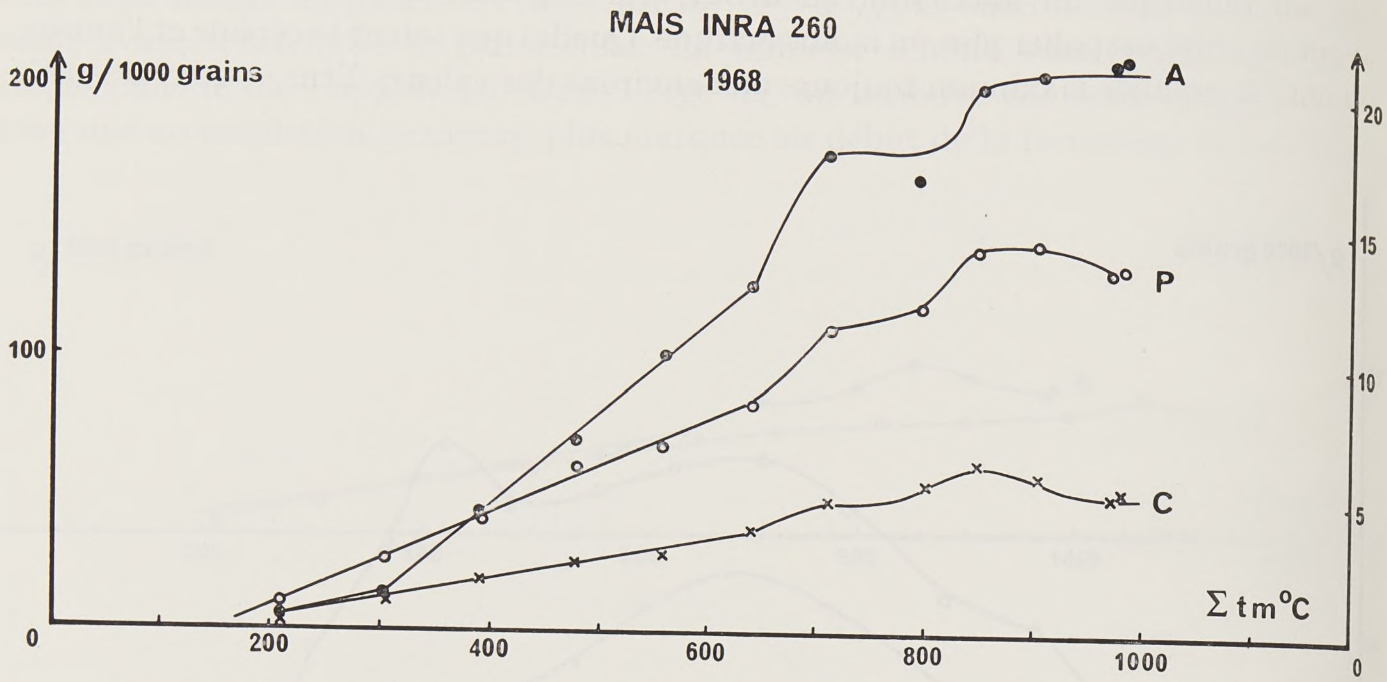



FIG. 7. — *Évolution de la quantité de polyholosides, exprimée en grammes pour 1 000 grains, en fonction de Σtm°C* (Maïs *INRA 260*, 1968)

Ordonnée gauche : A : amidon
Ordonnée droite : P : pentosanes
C : Cellulose

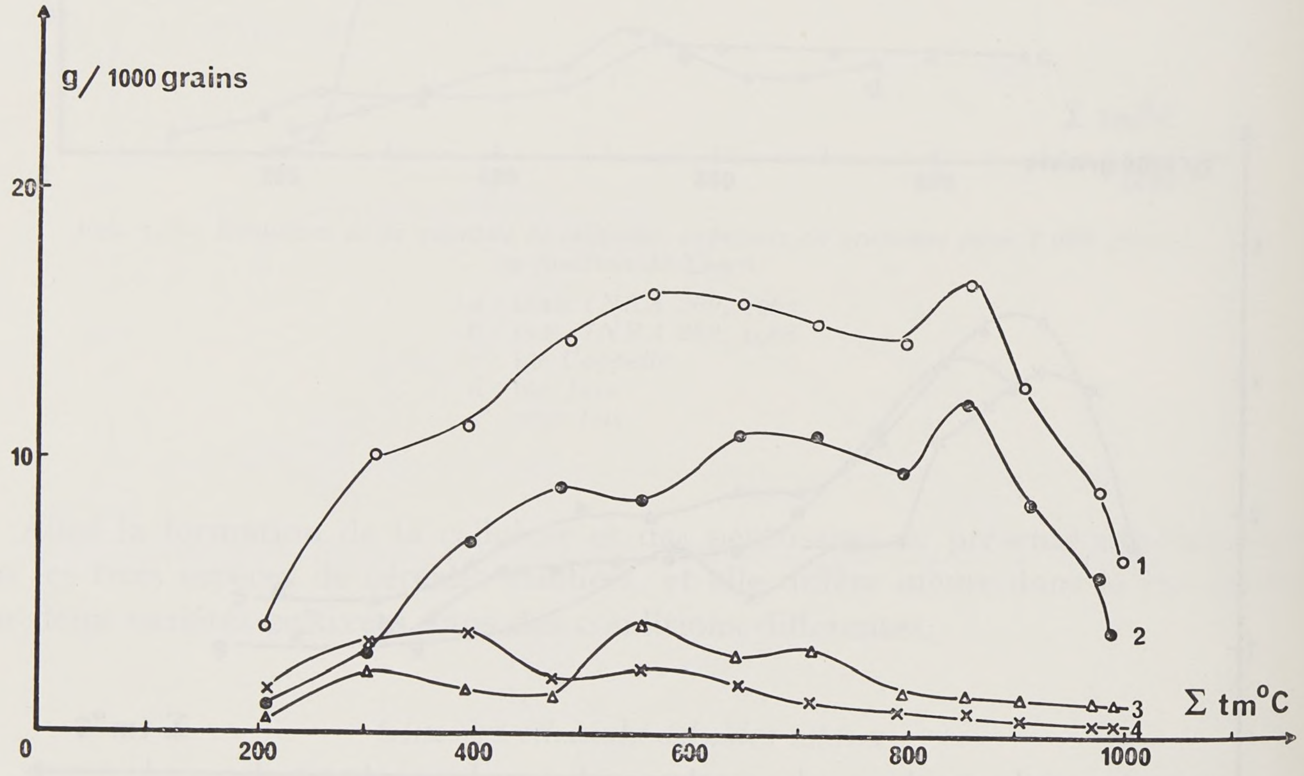



FIG. 8. — *Évolution de la quantité d'oses et d'oligosides, exprimée en grammes pour 1 000 grains, en fonction de Σtm°C* (Maïs *INRA 260*, 1968)

1 : glucides éthanolo-solubles totaux
2 : saccharose
3 : fructose
4 : glucose

## ÉVOLUTION DES DIVERS CONSTITUANTS GLUCIDIQUES PRÉSENTS DANS 1 000 GRAINS POUR CHAQUE ESPÈCE DE CÉRÉALE

### *Maïs*

Dans cette dernière partie, nous allons discuter comment évoluent dans chaque céréale ces divers constituants glucidiques. Les polyholosides, amidon, pentosanes et cellulose (fig. 7) du maïs présentent une évolution générale comparable. Les courbes se distinguent surtout au début par leurs pentes, et indiquent des valeurs différentes de quantités accumulées. Les fluctuations observées se situent aux mêmes périodes et aux mêmes valeurs $\Sigma tm°C$. Ceci est particulièrement net pour l'amidon et les pentosanes. Comme nous l'avons déjà indiqué par ailleurs, le palier entre $\Sigma tm = 850°$ et $950°C$, dans le cas de l'amidon et des pentosanes, s'explique probablement par une diminution momentanée de l'ensoleillement à cette période. Le début de la matière sèche apparaît plus tôt que le palier de l'accumulation des polyholosides ; ceci laisse prévoir une décroissance assez notable des oses et oligosides du grain. C'est en effet ce qui ressort de la figure 8 qui illustre l'évolution des glucides éthanolo-solubles totaux et parmi eux tout spécialement le saccharose. Le glucose montre peu de fluctuations, l'apparition du raffinose (tabl. 2), qui n'est pas représentée sur la figure, coïncide avec le dernier maximum des glucides éthanolo-solubles et le palier de la matière sèche. De la comparaison des courbes des oses et oligosides, il ressort notamment une variation inverse entre la quantité de saccharose accumulée d'une part, et celle de fructose d'autre part. En fait, tout se passe comme si le fructose, le glucose et le saccharose correspondaient à des termes de passage dans la synthèse des polyholosides étudiés. Les résultats obtenus en 1967 de la même variété de maïs étaient sensiblement comparables à ceux de 1968 (CERNING et GUILBOT, 1971).

### *Blé*

En ce qui concerne le blé *Cappelle* (fig. 9) et le blé *Joss* (fig. 11), on remarque encore une vitesse et une accumulation de l'amidon supérieures à celles des pentosanes et de la cellulose. Contrairement à l'observation faite dans le cas du maïs, l'allure des courbes de l'amidon est différente de celle de la cellulose et des pentosanes dans la première phase. Les glucides alcoolosolubles totaux (fig. 10 et 12), après un maximum au début, décroissent par paliers successifs ; cette diminution s'observe même au-delà du palier des polyholosides ; ceci laisse entendre que ces composants de faible poids moléculaire sont utilisés dans d'autres voies métaboliques, comme la respiration par exemple. Le saccharose, le fructose et les fructosanes évoluent de façon comparable avec toutefois un léger décalage des maximums et minimums.

### *Orge*

L'orge montre (fig. 13) une différence plus nette entre l'allure des courbes d'accumulation des pentosanes et de la cellulose par rapport à l'amidon. Les courbes des pentosanes et de la cellulose présentent globalement la même allure ; l'accumulation de ces deux constituants est rapide au début, elle est très vite suivie

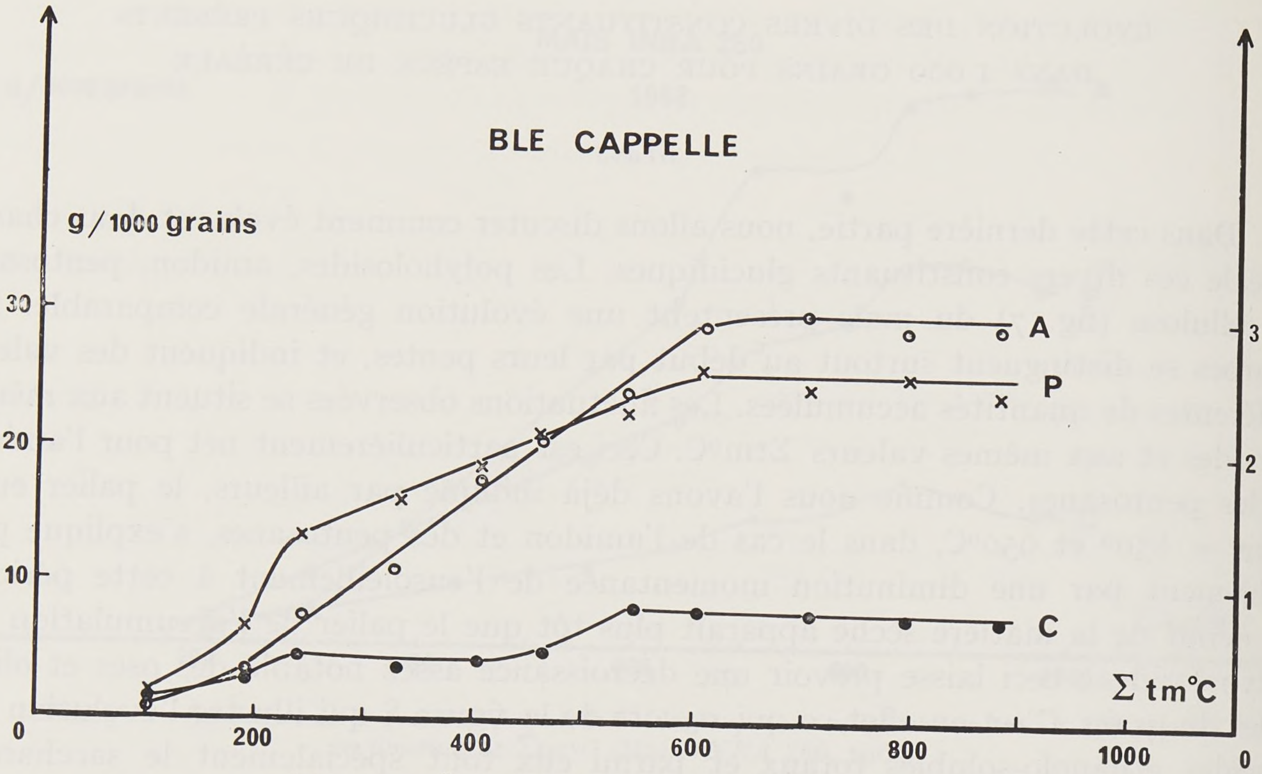



FIG. 9. — *Évolution de la quantité de polyholosides, exprimée en grammes pour 1 000 grains en fonction de* $\Sigma tm°C$ (Blé *Cappelle*)

Ordonnée gauche : A : amidon
Ordonnée droite : P : pentosanes
C : cellulose

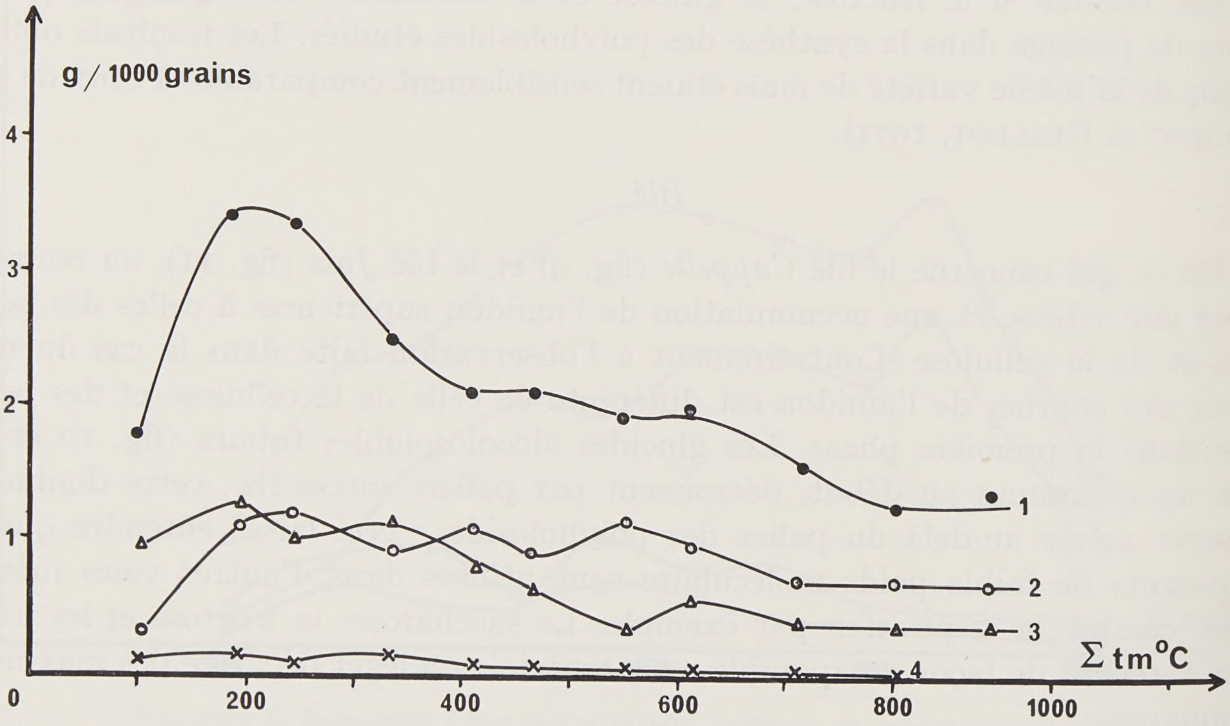



FIG. 10. — *Évolution de la quantité d'oses et oligosides, exprimée en grammes pour 1 000 grains en fonction de* $\Sigma tm°C$ (Blé *Cappelle*)

1 : glucides éthanolo-solubles totaux
2 : saccharose
3 : fructose et fructosanes
4 : glucose

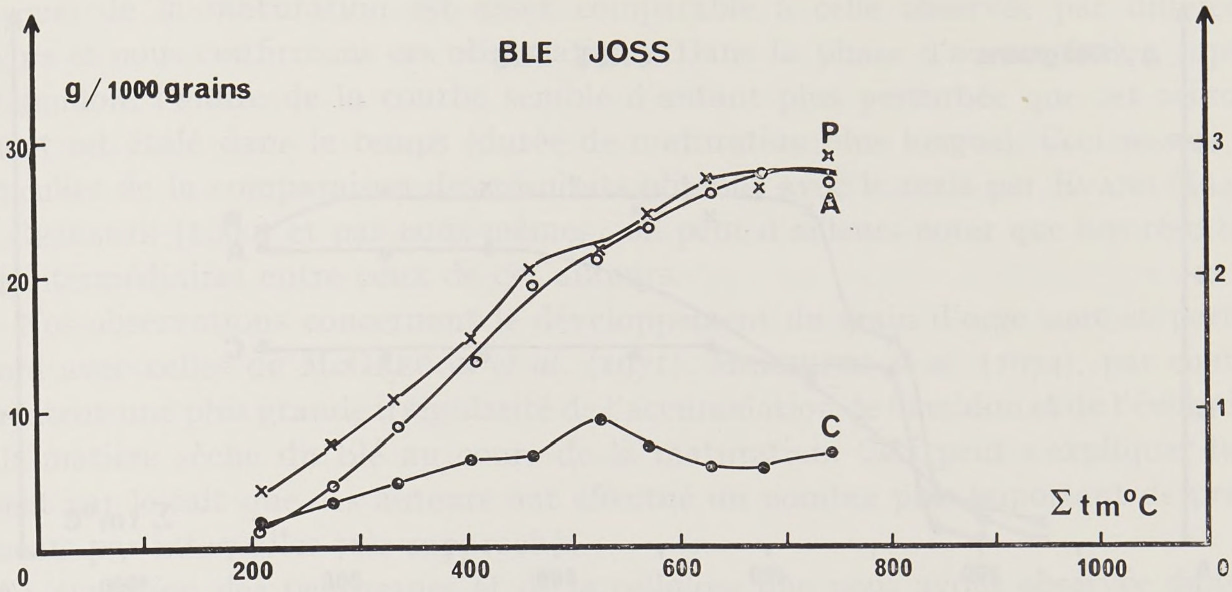



FIG. 11. — *Évolution de la quantité de polyholosides, exprimée en grammes pour 1 000 grains en fonction de Σtm°C* (Blé *Joss*)

Ordonnée gauche : A : amidon
Ordonnée droite : P : pentosanes
C : cellulose

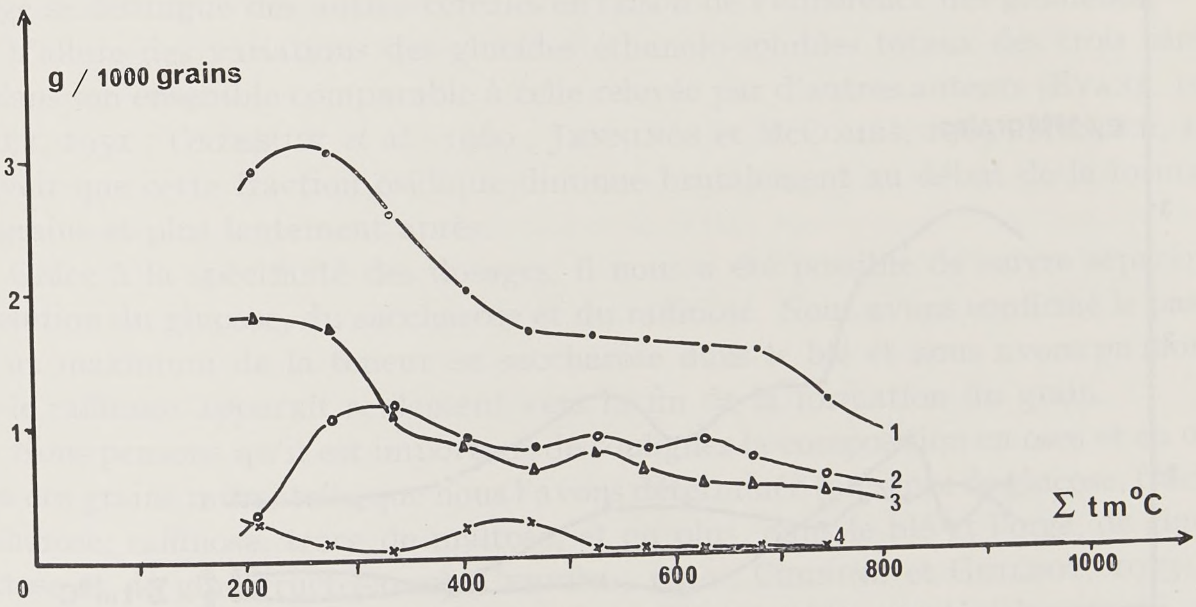



FIG. 12. — *Évolution de la quantité d'oses et oligosides, exprimée en grammes pour 1 000 grains en fonction de Σtm°C* (Blé *Joss*)

1 : glucides éthanolo-solubles totaux
2 : saccharose
3 : fructose et fructosanes
4 : glucose

d'une seconde accumulation, importante pour les pentosanes, plus faible pour la cellulose.

La quantité des sucres totaux (fig. 14) se trouve à son maximum au tout début de la formation des grains, elle diminue dès que commencent à croître les polyholosides. Le fructose et les fructosanes semblent plus impliqués dans le processus que le saccharose, dont la quantité varie moins pendant cette période. Au-delà, c'est au contraire la quantité de saccharose qui décroît pendant que l'amidon continue de s'accumuler.

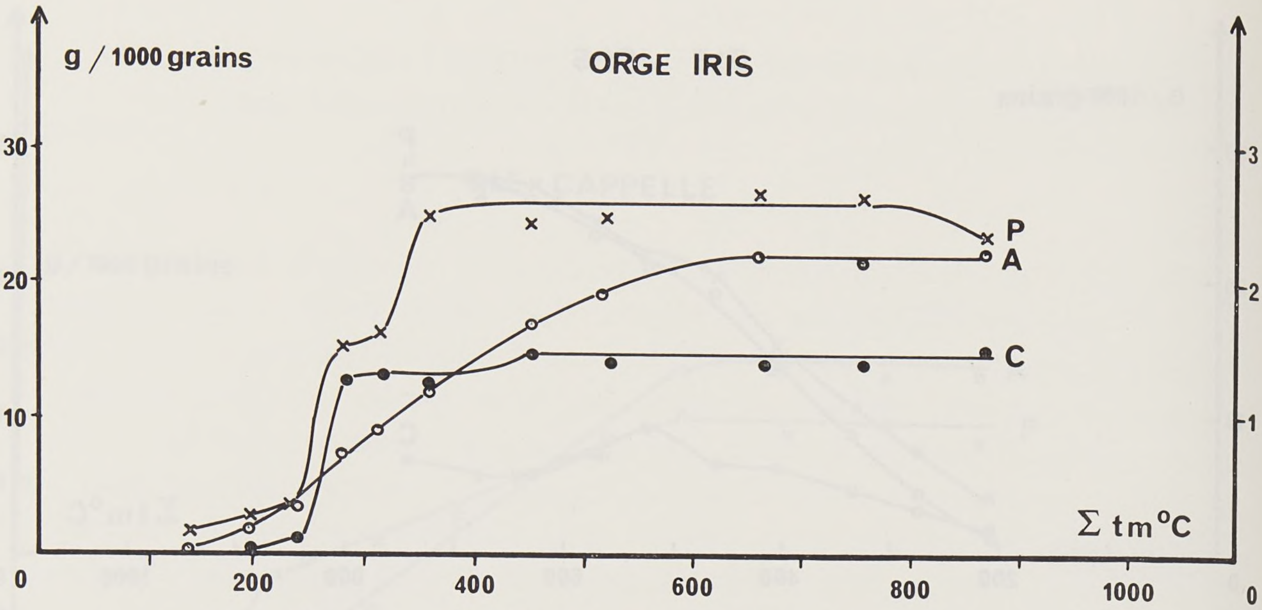



FIG. 13. — *Évolution de la quantité de polyholosides, exprimée en grammes pour 1 000 grains en fonction de* $\Sigma tm°C$ (Orge *Iris*)

Ordonnée gauche : A : amidon
Ordonnée droite : P : pentosanes
C : cellulose

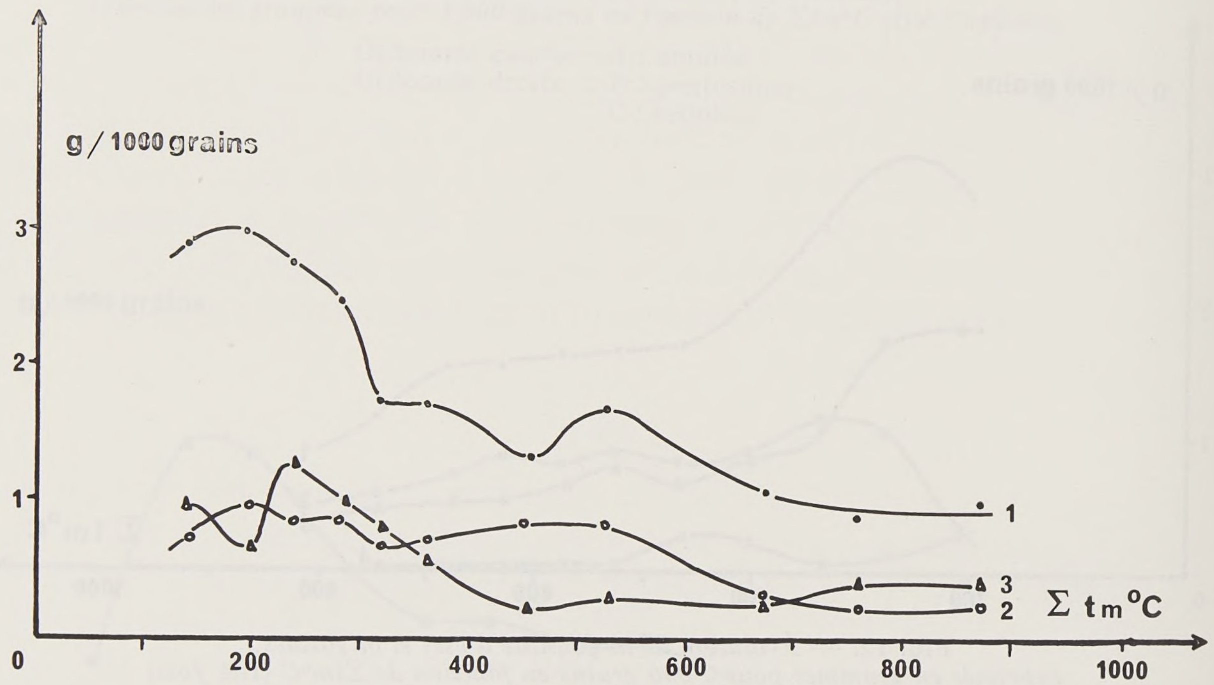



FIG. 14. — *Évolution de la quantité d'oses et d'oligosides, exprimée en grammes pour 1 000 grains en fonction de* $\Sigma tm°C$ (Orge *Iris*)

1 : glucides éthanolo-solubles
2 : saccharose
3 : fructose et fructosanes

## DISCUSSION ET CONCLUSION

La comparaison de nos résultats relatifs à l'évolution quantitative des glucides du grain exprimée en p. 100 de la matière sèche avec ceux indiqués par d'autres auteurs conduit aux remarques ci-après.

L'allure sigmoïde générale des courbes représentant l'évolution de l'amidon

au cours de la maturation est assez comparable à celle observée par différents auteurs et nous confirmons ces observations. Dans la phase d'accumulation rapide de l'amidon, l'allure de la courbe semble d'autant plus perturbée que cet accroissement est étalé dans le temps (durée de maturation plus longue). Ceci ressort en particulier de la comparaison des résultats obtenus avec le maïs par EVANS (1941), par GRZESUIK (1960) et par nous-mêmes ; on peut d'ailleurs noter que nos résultats sont intermédiaires entre ceux de ces auteurs.

Nos observations concernant le développement du grain d'orge sont en parfait accord avec celles de MCGREGOR *et al.* (1971). MEREDITH *et al.* (1974), par contre, constatent une plus grande irrégularité de l'accumulation de l'amidon et de l'évolution de la matière sèche du blé au cours de la maturation. Ceci peut s'expliquer facilement par le fait que ces auteurs ont effectué un nombre plus important de prélèvements par intervalles très rapprochés.

L'évolution des pentosanes et de la cellulose que nous avons observée dans le maïs rejoint celle trouvée respectivement par GRZESUIK (1960) et EVANS (1941), qui semblent être les seuls à avoir étudié précédemment les variations de ces constituants.

Nos résultats concernant ces deux types de polyholosides constituent pour le blé et l'orge les premières indications relatives à l'évolution de ces composants. L'orge se distingue des autres céréales en raison de l'adhérence des glumelles.

L'allure des variations des glucides éthanolo-solubles totaux des trois céréales est dans son ensemble comparable à celle relevée par d'autres auteurs (EVANS, 1941 ; EARLY, 1951 ; GRZESUIK *et al.*, 1960 ; JENNINGS et MCCOMBS, 1969 ; MENGER, 1961) à savoir que cette fraction osidique diminue brutalement au début de la formation des grains et plus lentement après.

Grâce à la spécificité des dosages, il nous a été possible de suivre séparément l'évolution du glucose, du saccharose et du raffinose. Nous avons confirmé le passage par un maximum de la teneur en saccharose dans le blé et nous avons pu montrer que le raffinose apparaît seulement vers la fin de la formation du grain.

Nous pensons qu'il est important de souligner la composition en oses et en oligosides des grains mûrs, telle que nous l'avons déterminée (présence de glucose, fructose, saccharose, raffinose, trace de maltose, et en plus, dans le blé et l'orge, de glucodifructose et de glucofructosanes) (CERNING, 1970 ; CERNING et GUILBOT, 1973), qui correspond à celle des grains récoltés dans des conditions optimales et qui n'ont pas été altérés par un stockage.

Il est donc possible que les différences de composition observées par quelques chercheurs soient dues à des conditions de stockage défectueuses ; les proportions parfois importantes de maltose et de ses homologues supérieurs (MENGER, 1961 ; GRZESUIK *et al.*, 1960), ainsi que la présence de mélibiose trouvée par certains auteurs, peuvent s'expliquer par l'intervention des amylases sur l'amidon, de l'invertase sur le raffinose. Remarquons également que selon l'espèce et la variété, les teneurs en ces différents composants glucidiques éthanolo-solubles peuvent varier sensiblement (CERNING et GUILBOT, 1974 ; MONTREUIL *et al.*, 1966).

L'expression des résultats rapportés à l'organe en cours de formation (quantité présente dans 1 000 grains) a permis de distinguer les glucides qui s'accumulent progressivement et plus ou moins rapidement dans le grain, (essentiellement amidon, pentosanes, cellulose et raffinose) de ceux dont la quantité passe par un ou une série

de maximums plus ou moins étalés au début pour diminuer en fin de maturation. Cette évolution des glucides solubles, en particulier la présence de maximums au début de la maturation, est plus marquée pour le blé et l'orge que pour le maïs. Ceci semble devoir être attribué à la présence dans les deux premiers de glucofructosanes, qui sont absents dans le maïs. De façon générale, ces oligosides ont tendance à diminuer en cours de maturation. On peut penser qu'ils sont dégradés par le jeu d'un certain nombre d'enzymes pour être utilisés soit dans la synthèse des polyholosides de réserve, soit dans d'autres voies métaboliques. Le fait de considérer le glucose et le fructose comme termes de passage rejoint l'hypothèse de certains auteurs (CARLES, 1956 ; HARRIS, 1962 ; MCGREGOR *et al.*, 1971), qui estiment que la synthèse de l'amidon se fait à partir des sucres, réducteurs ou non. Cependant il convient de remarquer qu'il n'est pas possible de tirer de telles conclusions à partir des résultats exprimés en p. 100 de la matière sèche, car le pourcentage de certains constituants diminue au cours de la maturation du simple fait de l'accumulation rapide de l'amidon. Il est erroné d'émettre, comme l'ont fait GRZESUIK *et al.* (1960), l'hypothèse de la transformation des pentosanes en amidon sur la base des résultats exprimés en p. 100 de matière sèche. Nous observons en effet, dans tous les cas, que l'évolution des pentosanes et de la cellulose, ou bien suit celle de l'amidon, ou bien montre un accroissement rapide pour aboutir à un palier.

L'allure générale de l'accumulation des constituants glucidiques reste sensiblement la même pour le maïs, le blé et l'orge. Cependant deux différences sont à souligner. On observe, d'une part, une accumulation très rapide des pentosanes et de la cellulose dans l'orge, ce qui peut s'expliquer par le fait que le grain de cette céréale n'est pas séparé de ses glumelles ; on note d'autre part l'existence d'un maximum du saccharose et du fructose au début de la formation des grains. La présence de ce maximum peut être due au développement pendant cette période de l'assise protéique (Laboratoire de Biochimie et Physico-chimie des Céréales, 1950) ; cette dernière est d'ailleurs plus importante dans le blé et l'orge que dans le maïs.

Nous nous sommes efforcés de présenter nos résultats non pas en fonction du nombre de jours écoulés depuis la floraison, mais en fonction de l'un des facteurs climatiques qui a, selon GESLIN et JONARD (1948), une action importante sur le développement du grain, tel que la somme des températures moyennes journalières accumulées depuis la floraison ($\Sigma$tm°C).

Ceci nous a permis, dans le cas du blé et de l'orge, d'observer certains points singuliers de l'évolution des glucides qui se situent indépendamment de l'année de culture, de l'espèce et de la variété, sensiblement aux mêmes valeurs de $\Sigma$tm°C. Nous avons ainsi pu observer que la fin de l'accumulation de l'amidon se situe toujours à des valeurs de $\Sigma$tm comprises entre 600° et 650°C, alors que le nombre de jours écoulés depuis la floraison varie plus largement (*Cappelle*, trente et unième jour, *Joss*, quarante-deuxième jour, *Iris*, quarante-deuxième jour). Nous avons également pu situer certaines variations par rapport au palier de l'eau (blé *Joss*) et des caractéristiques indiquant un échaudage.

Pour deux cultures successives d'une même variété de maïs en un même lieu, la fin de l'accumulation de l'amidon est atteinte en un même nombre de jours (70 jours), alors que les valeurs de $\Sigma$tm°C diffèrent de 50 unités. Il est évident que le facteur $\Sigma$tm°C ne tient compte que d'un des facteurs intervenant dans le développement du grain. Comme nous l'avons vu dans le cas du maïs, l'insolation et la plu-

viosité, entre autres, doivent être prises en considération. C'est ce qui nous a permis de noter pour le maïs l'influence vraisemblable de ces facteurs sur l'évolution des polyholosides tels que l'amidon et les pentosanes.

Notre étude confirme donc pour une part les observations antérieures ; elle a permis également, grâce à la spécificité des méthodes de dosages utilisées, de fournir des résultats plus précis et d'apporter quelques éléments nouveaux au sujet de certains constituants glucidiques. Enfin, nous avons pu préciser certains aspects de l'influence du climat qui peuvent contribuer à une meilleure connaissance de l'évolution des glucides des grains de céréales au cours de la maturation.

*Reçu pour publication en avril 1975.*

## SUMMARY

### CHANGES IN THE CARBOHYDRATE COMPOSITION DURING MATURATION OF THE MAIZE, WHEAT AND BARLEY KERNEL

Studies have been made on the change of the high-molecular carbohydrate composition (starch, pentosans, crude fiber), and the principal ethanol-soluble sugars (glucose, fructose, sucrose, raffinose, glucofructans) in the developing maize, wheat, and barley kernel. Samples were collected from the fields at 9 to 49 days after flowering at intervals of 3 to 4 days for wheat and barley, at 14 to 91 days at intervals of 7 days for maize. Carbohydrate analyses were carried out with adequate methods which result in values of good precision and reproducibility. The results are not only expressed on a dry basis, but also on a 1 000 kernel basis, which permits one to distinguish between the carbohydrates accumulating in the kernel (mainly starch, pentosans and crude fiber) and those which arise by an intermediate pathway (mainly glucose and sucrose). The results are given as a function of a climatic factor, the cumulative daily mean temperature from the point of flowering ($\Sigma$mt°C). Thus it is possible to compare not only one cereal grown in different years and various regions but also all cereals among each other. Starch development was found to be essentially comparable in the three cereals. However the end of starch accumulation of wheat and barley is observed between $\Sigma$mt = 600° and 650°C, while that of maize is observed between $\Sigma$mt = 850° and 900°C. Pentosans and crude fiber develop analogously to starch in the maize kernel. Pentosans of wheat develop analogously to starch in the case of the *Joss* variety, while they follow the evolution of crude fiber in the case of the *Cappelle* variety. Barley, a covered cereal, shows a very rapid and parallel accumulation of pentosans and crude fiber. The ethanol-soluble sugars show a maximum in the very early stage of development and then decrease to a more or less constant value. Some important phases in the formation of the carbohydrates become apparent and the relationship between the development of these components and the hydration of the kernel is discussed.

## ZUSAMMENFASSUNG

### ENTWICKLUNG DER KOHLENHYDRATE IM MAIS-, WEIZEN- UND GERSTENKORN WÄHREND DES REIFEPROZESSES

Die Entwicklung der hochmolekularen Kohlenhydrate (Stärke, Pentosane, Rohfaser) und der hauptsächlichen äthanollöslichen Zucker (Glucose, Fructose, Saccharose, Raffinose, Fructosane) wurde in reifenden Mais-, Weizen- und Gerstenkörnern verfolgt. Weizen-und Gerstenproben wurden in Zeitabständen von 3 *bis* 4 Tagen vom 9. *bis* zum 49. Tag nach der Blüte gezogen. Maisproben wurden in Zeitabständen von einer Woche vom 14. *bis* zum 91. Tag nach

der Blüte gezogen. Es wurden zu diesen Untersuchungen spezifischische Analysenmethoden herangezogen, die präzise und reproduzierbare Werte liefern. Die Resultate wurden nicht nur auf die Trockensubstanz sondern auch auf das Tausendkorngewicht umgerechnet. Die auf das Tausendkorngewicht bezogenen Ergebnisse erlauben eine Unterscheidung zwischen den sich tatsächlich im Korn ansammelnden Kohlenhydraten (Stärke, Pentosane, Rohfaser) und den intermediär gebildeten (Glucose, Saccharose). Die Ergebnisse wurden in Abhängigkeit von einem klimatischen Faktor dargestellt. Dieser Faktor ergibt sich aus der vom Zeitpunkt der Blüte an addierten durchschnittlichen Tagestemperatur ($\Sigma$dT°C). Auf diese Weise kann man nicht nur eine Getreideart unabhängig vom Standort und Anbaugebiet sondern auch verschiedene Getreidearten miteinander vergleichen. Der Verlauf der Stärkeeinlagerung war bei den drei Getreidearten ähnlich, allerdings wurde die maximale Stärkeeinlagerung bei Weizen und Gerste bei $\Sigma$dT = 600°C *bis* 650°C, die von Mais bei $\Sigma$dT = 850°C *bis* 900°C erreicht. Die Entwicklung der Pentosane und der Rohfaser verlief im Maiskorn parallel zur Stärkeeinlagerung. Im Weizen *Joss* wurden Pentosane und Stärke gleichzeitig gebildet, während im Weizen *Cappelle* Pentosane und Rohfaser nebeneinander angesammelt wurden. Bei Gerste wurde eine sehr schnelle parallel verlaufende Bildung von Pentosanen und Rohfaser beobachtet. Die äthanollöslichen Zucker zeigten einen maximalen Wert im frühsten Stadium des Reifeprozesses, danach nahmen sie mehr oder weniger regelmässig bis zu einem konstanten Wert ab. Es werden einige für die Bildung von Kohlenhydraten wichtige Phasen aufgezeigt und die Beziehung zwischen deren Bildung und der Hydratation der Körner erörtert.

## RESUMEN

### EVÓLUCION DE LA COMPOSICIÓN GLUCIDÍCA DE LOS GRANOS DE CEREALES DURANTE EL TRANSCURSO DE SU MADURACIÓN: MAÍZ, TRIGO, CEBADA

La evolución de las poliholosidas (almidón, pentosanas, materias celulósicas) y de los principales glúcidos etanolosolubles (glucosa, fructosa, sacarosa, rafinosa, glucofructosanas) ha sido seguida durante el transcurso de la maduración de los granos de maíz, de trigo y de cebada. Las muestras de trigo y de cebada han sido tomadas con intervalos de 3 a 4 días durante un periodo comprendido entre los 9 y los 49 días después de la floración. Las tomas de muestras de maíz han sido llevadas a cabo cada 7 días, durante un periodo comprendido entre los 14 y 91 días después de la floración. Los glúcidos han sido dosificados por medio de métodos específicos, que han permitido obtener una correcta precisión y reproductibilidad. Los resultados se refieren, en primer lugar, a la sustancia seca y, en segundo lugar, a 1 000 granos. Esta última expresión permite establecer la distinción de los glúcidos que se acumulan progresivamente en los granos (almidón, pentosanas, materias celulósicas) y aquellos que representan términos de paso (glucosa, sacarosa). Los resultados son presentados en función de un factor climático, a saber, la suma de las temperaturas de promedio diarias acumuladas desde la floración ($\Sigma$tm°C). De este modo es posible comparar, no sólo un cereal cultivado de un año a otro en el mismo lugar, sino también diversos cereales entre sí, procedentes de distintos lugares de cultivo. La forma general de la evolución del almidón es virtualmente la misma para los tres cereales considerados. No obstante, el final de la acumulación del almidón en el trigo y en la cebada es observada a $\Sigma$tm = 600° à 650°C, mientra que la misma se sitúa en $\Sigma$tm = 850° a 900°C cuando se trata del maíz. Las pentosanas y las materias celulósicas evolucionan paralelamente al almidón cuando se trata del maíz. Por el contrario, las pentosanas del trigo se acumulan de forma análoga al almidón en la variedad *Joss*, mientras que siguen la evolución de las materias celulósicas en la variedad *Capelle*. Tanto las pentosanas como las materias celulósicas se acumulan rápidamente y de forma paralela en el grano de cebada. Los glúcidos etanolosolubles totales llegan a su grado máximo muy al principio del desarrollo de los granos y disminuyen poco más o menos progresivamente para alcanzar un valor mínimo en los granos maduros. Los resultados permiten apreciar ciertas fases importantes en la formación de los glúcidos. Las relaciones existentes entre el desarrollo de estos componentes y la hidratación de los granos son examinadas y discutidas.

## RIASSUNTO

### EVOLUZIONE DELLA COMPOSIZIONE GLUCIDICA DEI CHICCHI DI CEREALI DURANTE LA LORO MATURAZIONE : MAIS, GRANO, ORZO

L'evoluzione dei poliolosidi (amido, pentosani, materie cellulosiche) e dei principali glucidi etanolo-solubili (glucosio, fruttosio, saccarosio, raffinosio, glucofruttosani) è stata oggetto di osservazioni durante la maturazione di chicchi di mais, di grano e di orzo. I campioni di grano e di orzo sono stati prelevati su intervalli di 3-4 giorni durante un periodo compreso tra 9 e 49 giorni dopo la fioritura. I prelevamenti del mais sono stati effettuati ogni 7 giorni per un periodo che va da 14 a 91 giorni dopo la fioritura. I glucidi sono stati dosati mediante dei metodi specifici che permettono di avere una buona precisione e una buona riproducibilità. I risultati si riferiscono da una parte alla sostanza secca e, d'altra parte, a 1 000 chicchi. Quest'ultima osservazione permette di distinguere i glucidi che si accumulano progressivamente nei chicchi (amido, pentosani, materie cellulosiche) da quelli che rappresentano dei termini di passaggio (glucosio, saccarosio). I risultati sono presentati in funzione di un fattore climatico : la somme delle temperature medie quotidiane accumulate dopo la fioritura (ΣtmºC). E' possibile cosi confrontare non solo un cereale coltivato da un anno all'altro in uno stesso luogo ma anche diversi cereali tra loro provenienti da diversi luoghi di coltura. L'andamento generale dell'evoluzione dell'amido è sensibilmente uguale per i tre cereali. La fine dell'accumulazione dell'amido nel grano e nell'orzo è tuttavia osservata a Σtm = da 600º a 650ºC mentre per il mais, essa si situa a Σtm = da 850º a 900ºC. Nel mais, i pentosani e le materie cellulosiche evolgono parallelamente all'amido. I pentosani del grano invece si accumulano in modo analogo all'amido per quanto riguarda la varietà *Joss* mentre segueno l'evoluzione delle materie cellulosiche per la varietà *Cappelle*.

Nel chicco d'orzo, pentosani e materie cellulosiche si accumulano rapidamente in modo parallelo. I glucidi etanolo-solubili totali si trovano alloro punto massimo proprio all'inizio dello sviluppo dei chicchi e diminuiscono più o meno progressivamente per raggiungere un valore minimo nei chicchi maturi. I risultati mettono in evidenza alcune fasi importanti nella formazione dei glucidi ; d'altro canto, sono oggetto di discussioni i rapporti esistenti tra lo sviluppo di questi costituenti e l'idratazione dei chichi.


## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES


Cerning J., 1970. *Contribution à l'étude de l'évolution de la composition glucidique des grains de céréales au cours de leur maturation : maïs, blé, orge.* Thèse de doctorat d'Université, mention Sciences, Lille.

Cerning J., Guilbot A., 1971. Die Entwicklung hochmolekularer Kohlenhydrate im Maïskorn während des Reifeprozesses. *Die Stärke*, **23**, 238-244.

Cerning J., Guilbot A., 1973 *a*. A specific method for the determination of pentosans in cereals and cereal products. *Cereal Chem.*, **50**, 176-184.

Cerning J., Guilbot A., 1973 *b*. Changes in the carbohydrate composition during development and maturation of the wheat and barley kernel. *Cereal Chem.*, **50**, 220-232.

Cerning J., Guilbot A., 1974. Carbohydrate composition of wheat. In Inglett G. E., *Wheat : production and utilization*, 146-185. Avi Publishing Co., Westport, U. S. A.

Cerning-Beroard J., 1975. The use of invertase for determination of sucrose. Application to cereals, cereal products and other plant materials. *Cereal Chem.* (sous presse).

C. N. E. R. N. A., 1958. *Méthodes analytiques des Céréales du C. N. E. R. N. A.*

Early E. B., 1952. Percentage of carbohydrates in the kernel of station red yellow dent corn at several stades of development. *Plant Physiol.*, **27**, 184-190.

Evans J. W., 1941. Changes in the biochemical composition of the corn kernel during development. *Cereal Chem.*, **18**, 468-473.

Geslin H., Jonard J., 1948. Maturation du blé et climat. Les journées scientifiques du pain. *Ann. Nutr. Alim.*, **2**, 111-121.

GRZESIUK St., PIECZENCZYK J., REJOWSKI A., 1960. Les sucres du grain de maïs (*Zea mays* ssp. *indurata*) au cours du développement (en polonais). *Hodowla Roslin, Aklimatyzacja i Nasiennictwo*, **4**, 97-110.

HARRIS G., McWILLIAM I. C., 1954. Carbohydrates in malting and brewing. II. Changes in the carbohydrates of barley during ripening, drying and storage. *J. Inst. Brewing*, **60**, 387-395.

HARRIS G., McWILLIAM I. C., 1958. A note on the development of the starch of the ripening barley ear. *Cereal Chem.*, **35**, 82-83.

HARRIS G., 1962. In COOK A.H., *Barley and malt. The structural chemistry of barley and malt*, 431-582, Academic Press, New York and London.

INGLE J., BEITZ D., HAGEMANN R. H., 1965. Changes in composition during development and maturation of maize seeds. *Plant Physiol.*, **40**, 835-839.

JENKINS L. D., LONEY D. P., MEREDITH P., 1974. Periodicity of growth and starch deposition in the developing wheat grain. *Cereal Chem.*, **51**, 718-733.

JENNINGS P. H., McCOMBS C. L., 1969. Effects of sugary-1 and shrunken-2 loci on the kernel carbohydrate contents, phosphorylase and branching enzyme activities during maize kernel ontogeny. *Phytochemistry*, **8**, 1357-1363.

JOHNSON G., LAMBERT C., JOHNSON D. K., SUNDERWIRTH S. G., 1964. Colorimetric determination of glucose, fructose and sucrose in plant material using a combination of enzymatic and chemical methods. *J. Agric. Food Chem.*, **12**, 216-219.

Laboratoire de Biochimie et Physico-chimie des Céréales, I. N. R. A., 1950. Étude biochimique de la formation du grain de blé. *Ind. Agric. Alim.*, (1-2), 43-49.

McGREGOR A. W., LABERGE D. E., MEREDITH W. O. S., 1971. Changes in barley kernels during growth and maturation. *Cereal Chem.*, **48**, 255-269.

MENGER A., 1961. Untersuchungen über die Möglichkeiten einer Beziehung zwischen löslichen Kohlenhydraten im Durumweizen und nicht enzymatischen Bräunungserscheinungen. *Bericht über die Getreidechemikertagung*, 7-9 juin, *Arbeitsgemeinschaft Getreideforschung* A. G. Detmold.

MONTREUIL J., MONSIGNY M., LECLERCQ-DUCATEL G., MERCIER C., TOLLIER M. T., GUILBOT A., 1966. Influence des conditions de production, de récolte et de stockage sur la composition biochimique des céréales ; répercussion des variations sur la valeur nutritionnelle. II. Glucides. *Ann. Nutr. Alim.*, **20** (2), 165-175.

ROHRLICH M., ESSNER W., 1960. Untersuchungen über die Mono-und Oligosaccharide im reifenden Korn. *Getreide und Mehl*, **10**, 121-125.

SHANNON J. C., 1968. A procedure for the extraction and fractionation of carbohydrates from immature *Zea mays* kernels. *Research Bulletin*, nº 842, august, Purdue University, Lafayette, Indiana.

THIVEND P., MERCIER C., GUILBOT A., 1972. Determination of starch with glucoamylase. In WHITSLER R. L., BEMILLER J. N., *Method in carbohydrate chemistry*, VI. *General carbohydrate method*. 100-105. Academic Press, New York and London.

WEENDE, 1968. Méthodes officielles d'analyses des aliments des animaux. *F. N. I. A. A.*, Paris.

*Ann. Technol. agric.*, 1975, **24** (2), 171-192.

# LES INVERTASES DU RAISIN ET DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*. LEUR PARTICIPATION RESPECTIVE A L'HYDROLYSE DU SACCHAROSE AJOUTÉ A LA VINIFICATION

R. CORDONNIER, C. BIRON et A. DUGAL

*Station de Technologie végétale,*
*Centre de Recherches de Montpellier, I. N. R. A.,*
*34060 Montpellier*

## RÉSUMÉ

Le raisin possède une β-D-fructofuranoside-fructohydrolase qui hydrolyse le saccharose à une vitesse maximale pour une température de 80°C et un pH voisin de 1,8 ; l'enzyme est exceptionnellement stable à la chaleur, très résistante au $SO_2$, sensible à l'éthanol, elle présente des activités transférases.

Le potentiel invertasique du raisin, localisé pour partie dans les tissus de la baie, pour partie dans le suc vacuolaire, est très élevé et suffisant pour hydrolyser le saccharose ajouté au moût avant l'intervention des levures. L'attaque du raisin par *Botrytis cinerea* s'accompagne d'une perte de la moitié environ de son potentiel invertasique.

*Saccharomyces cerevisiae* est également pourvue d'une invertase, dotée d'activités transférases, qui hydrolyse le saccharose à une vitesse maximale pour un pH de 5,0 et une température de 55°C. Elle est liée pour l'essentiel à la cellule sur un site facilement accessible au substrat de sorte qu'elle fonctionne comme une enzyme fixée. Le potentiel invertasique de la levure dépend pour une large part de la composition du milieu dans lequel elle croît, celui des levures cultivées sur moût de raisin est toujours très faible et presque négligeable par rapport au potentiel invertasique du raisin.

Les activités transférases ne laissent pas dans le milieu de produits intermédiaires décelables, suivant les techniques utilisées, de l'hydrolyse du saccharose qui pourraient être les témoins de la chaptalisation.

Mots clés : *invertase, raisin, levure.*

## I. — INTRODUCTION

La capacité de la baie de raisin, comme aussi des autres organes du cep de vigne, d'hydrolyser le saccharose est connue depuis longtemps (MARTINAND, 1900 ; GUICHARD, 1954). L'enzyme responsable a été isolée et quelques-unes de ses propriétés précisées.

C'est une β-D-fructofuranoside-fructohydrolase (E.C. 3-2-1-26) qui présente une activité maximale à pH 2,0 pour une concentration en saccharose de 0,1M. Elle hydrolyse le raffinose deux fois moins vite que le saccharose et est dotée d'activités transférases. Elle est stable à 30°C de pH 2 à 7,0. A 85°C son inactivation est rapide et irréversible, elle est inhibée par les métaux lourds (ARNOLD, 1965) et se présente hétérogène à l'électrophorèse sur gel de polyacrylamide (PALLAVICINI, 1971).

Lors de son extraction à partir du raisin frais, une part de l'enzyme est récupérée sous une forme soluble non sédimentable à 20 000 *g*, l'autre part restant solidement fixée aux débris cellulaires qui n'empêchent pas l'enzyme d'être facilement accessible au substrat et de réagir comme l'enzyme soluble (ARNOLD, 1966 *a*, 1966 *b*). Mais lorsque le raisin est broyé en présence de Carbowax-4000, de détergents non ioniques ou de protéines, la totalité de l'enzyme peut être récupérée sous forme soluble.

Tout se passe donc comme si l'invertase liée était un artefact d'extraction dû à une grande aptitude de l'enzyme à former des complexes tanins-protéines et (ou) tanins-protéines-parois cellulaires (HAWKER, 1969). Les liens qu'elle forme avec les tissus végétaux sont d'ailleurs assez solides pour qu'elle puisse servir de modèle d'enzyme fixée (ARNOLD, 1966 *c*).

*In vivo*, sa fonction physiologique est de participer aux mécanismes d'accumulation du fructose et du glucose dans la baie en assurant l'inversion du saccharose qui constitue la forme de transport des glucides chez la vigne (SWANSON et EL-SHISHINY, 1958).

*In vitro*, dès le broyage du raisin, elle assure l'inversion rapide et complète du saccharose qu'il contient ou qui lui est ajouté ; ainsi un litre de moût peut hydrolyser de 50 à 100 grammes de saccharose en 24 heures à la température ambiante (JAULMES et HAMELLE, 1960 ; BARTFAY, 1969). Les moûts clarifiés par centrifugation ou filtration sont moins actifs et l'activité perdue se retrouve dans les bourbes (PALLAVICINI, 1967 ; BARTFAY, 1969 ; WEBER, 1972).

Pendant la fermentation alcoolique, on observe une chute de l'activité qui viendrait essentiellement de la sédimentation des bourbes et des lies (WEBER, 1972). Les vins ont donc une activité invertasique moins élevée que celle des moûts mais suffisante cependant pour rendre le plus souvent assez rapidement inefficace la détection du saccharose ajouté frauduleusement (GUIMBERTEAU et PEYNAUD, 1964). L'activité du vin diminue ensuite progressivement au cours de sa conservation (TARANTOLA, 1950), mais elle peut être cependant encore non négligeable dans des vins vieux d'une dizaine d'années (PALLAVICINI, 1966).

L'enzyme est très résistante à l'anhydride sulfureux (FALLOT et MICHON, 1900 ; TARANTOLA, 1950) et elle est partiellement inhibée par l'éthanol (FALLOT, 1900 ; TARANTOLA, 1950).

La participation de la levure à l'inversion du saccharose lors de la vinification est considérée comme importante dans la plupart des traités d'œnologie alors que des travaux récents semblent montrer qu'elle est au contraire négligeable (BARTFAY, 1969 ; WEBER, 1972). De plus, le potentiel invertasique de *Saccharomyces cerevisiae* isolée du vin n'a pas été étudié et nous ne savons rien du matériel enzymatique qui le compose bien que l'invertase de la levure d'autres origines soit connue depuis longtemps (BERTHELOT, 1860) et qu'elle ait fait l'objet d'une masse considérable de travaux (MYRBACK, 1960).

Le travail décrit dans ce mémoire a eu pour objet de préciser la participation respective des invertases du raisin et de la levure à l'hydrolyse du saccharose ajouté à la vinification et d'apporter quelques informations sur leurs propriétés d'intérêt technologique, notamment en ce qui concerne le matériel enzymatique de la levure. Nous avons en outre cherché à nous rendre compte si l'hydrolyse enzymatique du saccharose ne laissait pas dans le milieu des composés intermédiaires de la réaction, témoins d'activités transférases qui, sur le plan technologique, permettraient de mettre en évidence la pratique de la chaptalisation.

## II. — MATÉRIEL ET TECHNIQUES

### A. — *Matériel végétal*

*Le raisin.*

Les expériences ont été conduites soit sur des jus de raisin frais, pulpeux ou clarifiés par centrifugation à 15 000 *g* pendant 10 minutes, soit sur des poudres acétono-alcooliques de baies préparées selon une technique déjà décrite (Cordonnier, Dugal, 1968).

Les jus pauvres en enzymes peuvent être dialysés 24 heures dans des boyaux de cellophane contre du tampon acétate 0,02M pH 4,0 ce qui permet d'éliminer 99 p. 100 des sucres réducteurs et d'accroître ainsi la sensibilité de la méthode de mesure des activités.

Le traitement des baies ou des pulpes séparées du jus par l'acétone est une excellente méthode de stabilisation du matériel enzymatique qui peut être ainsi conservé plusieurs mois.

Les activités peuvent être mesurées soit directement sur les poudres mises en suspension dans le mélange d'incubation de façon à apprécier les activités correspondant à la fois à l'invertase soluble et liée, cette dernière étant difficilement extractible (Arnold, 1966 *a*), soit sur des extraits préparés à partir de ces poudres.

L'extraction est alors réalisée au moyen de tampon acétate 0,1M pH 4,0 auquel la poudre acétonique est ajoutée à raison de 20 à 50 mg de poudre par ml de tampon, la suspension étant ensuite traitée à froid avec un homogénéiseur de type Potter, mise à macérer sous agitation une nuit à + 3°C puis centrifugée à 10 000 *g* pendant 10 minutes.

*Les vins.*

Ils sont centrifugés à 5 000 *g* 10 minutes de façon à les débarrasser des cellules de levure.

*Les levures.*

Les activités invertasiques sont mesurées soit directement sur les cellules en suspension dans leur milieu de culture ou un tampon soit sur des extraits de poudre acétonique de levure, soit encore sur des autolysats.

Les levures ont pour origine une souche de *Saccharomyces cerevisiae* isolée du vin, de la collection du laboratoire. Elle sont cultivées sur jus de raisin stérilisé à 120°C pendant 20 minutes ou sur le milieu synthétique de base suivant : yeast extract 5 g, phosphate diammonique 1 g, glucose 20 g, acide tartrique 2 g, pH 3,5, eau 1 litre. Des variantes qui seront précisées dans le texte sont parfois apportées à ces milieux de base. Les cellules sont récoltées par centrifugation en fin de croissance exponentielle et conservées congelées à — 20°C ou sous forme de poudre acétonique.

Les poudres acétoniques sont préparées de la façon suivante : 50 à 100 grammes de levures fraîchement récoltées sont mises en suspension dans 100 ml d'eau désionisée que l'on verse lentement sous agitation énergique dans un litre d'acétone à — 20°C ; après repos d'une demi-heure à — 10°C, les cellules sont récupérées par filtration, sur Buchner, traitées une nouvelle fois par 500 ml d'acétone, filtrées, lavées sur le filtre par 200 ml d'éther à —20°C, séchées sous succion d'une trompe à vide et conservées en flacon bouché à 0°C.

Les extraits de poudre sont réalisés au moyen de tampon acétate 0,05 M pH 5,0 auquel la poudre est ajoutée à raison de 50 mg par ml de tampon, la suspension étant ensuite traitée avec un homogénéiseur de type Potter, puis centrifugée 10 minutes à 10 000 *g*.

Les autolysats sont obtenus par macération pendant 24 heures à 35°C de 20 grammes de levures additionnés de 2 ml de toluène dans 20 ml de tampon acétate 0,05M pH 5,0, les cellules étant ensuite séparées par centrifugation à 15 000 *g* pendant 20 minutes.

B. — *Mesure des activités*

La préparation enzymatique ajustée au pH désiré est mise à incuber à une température donnée avec un volume déterminé de substrat. Aux temps 0, 1, 2, ... *n*, des parties aliquotes du mélange d'incubation sont pipetées dans un volume égal de $Na_2CO_3$ 0,2M de façon à stopper la réaction, puis filtrées.

L'hydrolyse du substrat est appréciée dans les limites de temps où elle est proportionnelle à la durée d'incubation en dosant les sucres réducteurs formés par la méthode colorimétrique de Nelson (1944), Ashwell (1957), sur des volumes de filtrats ne contenant pas plus de 200 microgrammes de sucres réducteurs.

Les activités sont exprimées en micromoles de saccharose hydrolysées et l'unité d'invertase définie comme la quantité d'enzyme qui hydrolyse une micromole de saccharose en 60 minutes dans les conditions expérimentales choisies.

*Modes opératoires.*

1. *Mesure des activités du raisin et du vin.*

Les mélanges d'incubation 0,15M en saccharose, 0,02M en tampon acétate, pH 4,0 renfermant soit :

— 1 à 2 ml de jus pulpeux ou clair ;
— 50 à 100 mg de poudre acétonique ;
— 5 ml d'extrait de poudres ;
— 5 ml de vin

sont mis à incuber à 50°C pour les analyses de routine ou à toute autre température choisie pour les expériences. Le volume total des mélanges réactionnels est de 50 ml pour les jus et les poudres acétoniques, de 25 ml pour les vins ou les extraits de poudre.

Aux différents temps n'excédant pas en général 60 minutes pour les jus et les poudres de raisin, allant jusqu'à 4 heures pour les vins, des parties aliquotes de 2 ml sont pipetées dans 2 ml de $Na_2CO_3$ 0,2M, filtrées si nécessaire et les sucres réducteurs dosés sur 50 microlitres de ces filtrats dilués ou non suivant leur teneur en sucre.

Dans le cas des poudres, du tween 80 est incorporé au mélange d'incubation à une concentration de 0,02 p. 100 de façon à augmenter la mouillabilité des suspensions et à éviter ainsi leur adhérence sur les parois du récipient d'incubation et des pipettes.

Pour les températures d'incubation supérieures à 50°C et pour des mesures d'activités à un pH inférieur à 4,0, il est tenu compte dans le calcul des résultats de l'hydrolyse thermique du substrat.

2. *Mesure des activités de la levure.*

Vingt-cinq ml des mélanges d'incubation 0,15M en saccharose, 0,02 M en tampon acétate pH 5,0, renfermant soit :

— 2 à 5 ml d'autolysat ;
— 5 ml de suspension de levure à 5 ou $10^6$ cellules par ml ;
— 100 à 200 mg de poudre acétonique ;
— 5 ml d'extrait de poudre

sont mis à incuber à 50°C pour les analyses de routine ou à toutes autres températures choisies pour les expériences.

Aux différents temps n'excédant pas en général 60 minutes, des parties aliquotes de 2 ml sont pipetées dans 2 ml $Na_2CO_3$ 0,2M, filtrées si nécessaire et les sucres réducteurs dosés sur 50 microlitres de ces filtrats.

Dans le cas des suspensions de cellules, de la mycostatine est incorporée au mélange réactionnel à une concentration de 30 microgrammes par ml de façon à éviter la glycolyse des sucres réducteurs pendant le temps d'incubation avec le saccharose (Sutton et Lampen, 1962 *a*).

3. *Mesure des activités α-glucosidase et α-galactosidase.*

Le saccharose et le raffinose, substrats de l'invertase, étant susceptibles d'être attaqués aussi par respectivement les α-glucosidase et α-galactosidase, nous avons cherché à déceler ces enzymes dans le raisin et la levure en testant leurs activités (*a*) sur deux substrats chromogènes, le *p*.nitrophényl-α-glucopyranoside et le *p*.nitrophényl-α-galactopyranoside (Koch-Light) et (*b*) sur leurs substrats naturels, le maltose et le mélézitose pour l'α-glucosidase, le mélibiose pour l'α-galactosidase.

*a*) Dix ml de mélange réactionnel 0,004M en substrat chromogène et 0,04M en tampon acétate pH 4,0 renfermant 225 mg de poudre acétonique de raisin ou de levure sont mis à incuber à 40°C. Aux temps 0-60 et 120 minutes, des parties aliquotes sont pipetées dans un volume égal de $Na_2CO_3$ 0,2M pour arrêter la réaction enzymatique ; l'intensité de la coloration jaune que développe le *p*.nitrophénol est alors mesurée à 400 nm.

*b*) Dix ml de mélange réactionnel 0,10M en substrat naturel et 0,02M en tampon acétate pH 4,0 pour le raisin et 5,0 pour la levure, renfermant 60 mg de poudre acétonique de raisin ou 200 mg de poudre acétonique de levures sont mis à incuber à 40°C. Après 6 h et 9 h d'incubation, des parties aliquotes sont chromatographiées sur plaque de cellulose MN 300.

4. *Mesure des activités transférases.*

Cinquante ml de mélange d'incubation 0,30M en saccharose, 0,02M en tampon acétate aux pH choisis pour l'expérience, renfermant 100 mg de poudre acétonique de levure ou 5 ml d'extrait dialysé de poudre de raisin à 100 mg par ml sont mis à incuber à 30°C.

Aux différents temps à partir du temps 0, des parties aliquotes de 2 ml sont prélevées, portées à 100°C pendant 1,5 minutes dans un bain-marie bouillant et les produits d'hydrolyse soumis à une chromatographie sur plaque de cellulose MN 300.

5. *Chromatographie des sucres.*

Elle est réalisée sur des plaques (20 × 20 cm) de cellulose MN 300 (Macherey, Nagel et C°). Cinq à 10 microlitres des solutions à analyser sont déposés en bandes fines de 10 mm de longueur à 2,5 cm du bord inférieur des plaques. Celles-ci sont d'abord laissées pendant une heure dans une enceinte close saturée d'eau puis mises à développer à 20°C dans une cuve contenant le solvant de développement : méthyl-éthylcétone, eau, acide acétique, (9 : 2 : 1, V/V), (ANDERSEN *et al.*, 1969), qu'on laisse migrer jusqu'à 1 cm du haut de la plaque.

On procède ainsi à trois migrations successives en prenant soin, entre chacune d'elles, d'éliminer le solvant et de saturer à nouveau les plaques en eau. Elles sont ensuite séchées dans un courant d'air chaud et les sucres révélés par pulvérisation d'un mélange de diphénylamine 2 p. 100, aniline 2 p. 100, dans l'éthanol et $H_3PO_4$ d = 1,70,(5 : 5 : 1, V/V) puis chauffage à l'étuve à 90°C pendant huit minutes.

## III. — RÉSULTATS

### A. — *Mise en évidence et caractérisation des invertases du raisin et de la levure*

Les activités invertasiques du raisin et de la levure sont aisément mises en évidence en mettant à incuber par exemple 1 ml de jus pulpeux de raisin ou 1 ml d'autolysat de levure à 40°C dans 25 ml d'une solution tamponnée à pH 4,0 de saccharose 5 p. 100 et en dosant les sucres réducteurs formés dans le milieu réactionnel.

Les activités sont maximales pour une concentration en saccharose de 0,15M à un pH voisin de 1,8 et une température voisine de 80°C pour le raisin et à un pH de 5,0 et 55°C pour la levure (fig. 2 et 3).

Si l'on suit l'hydrolyse du saccharose par chromatographie sur plaque de cellulose de parties aliquotes du mélange réactionnel, on voit apparaître des produits intermédiaires de la réaction migrant plus lentement que le saccharose, le fructose et le glucose et qui disparaissent en fin de réaction (fig. 4). En présence d'éthanol, il se forme un éthyl-fructoside qui disparaît lui aussi lorsque tout le saccharose a été hydrolysé.

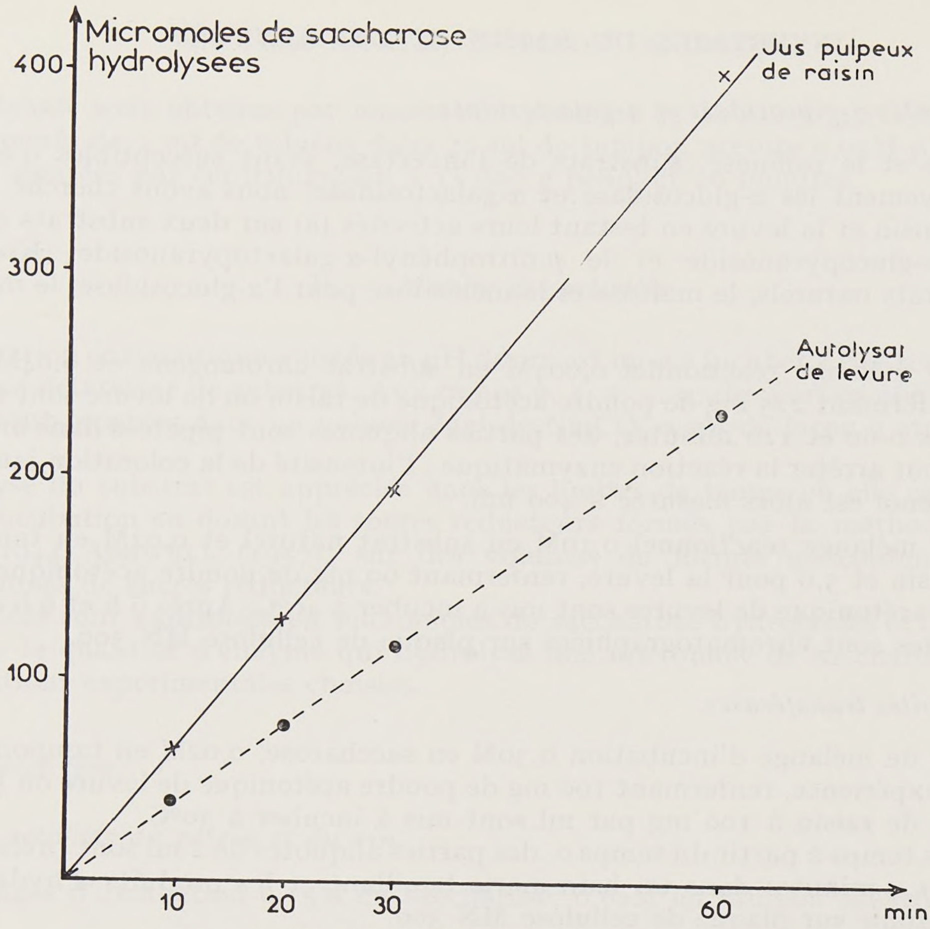



FIG. 1. — *Activités invertasiques du raisin et de la levure*

Hydrolyse du saccharose par un jus pulpeux de raisin et un autolysat de levure à pH 4,0 et 40°C. Les activités sont exprimées en micromolécules de saccharose hydrolysées par ml de jus et d'autolysat

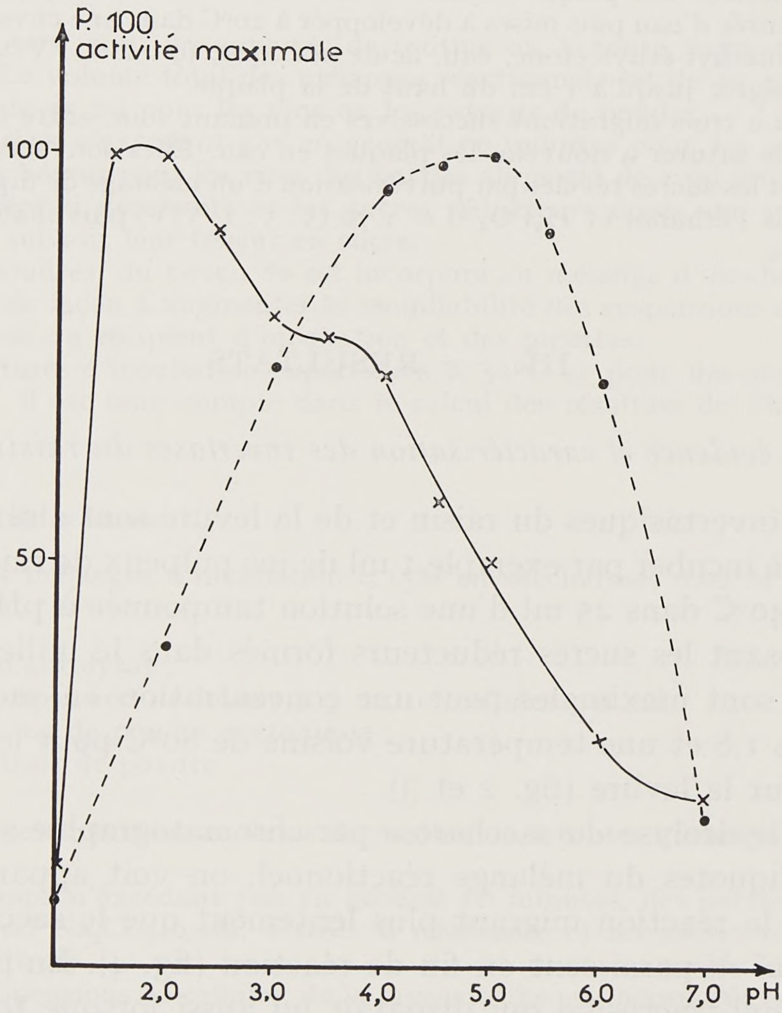



FIG. 2. — *Effet du pH sur les activités invertasiques du raisin et de la levure*

Activités du raisin ×———× et de la levure •- - - - - - - -•, mesurées à 37°C

Ces produits intermédiaires sont les témoins d'activités transférases. Nous les avons mis en évidence facilement dans le cas de l'invertase de la levure, mais plus difficilement dans le cas de l'invertase du raisin, quels que soient les pH testés (3,5-4 et 5,0). Les fortes concentrations en saccharose (0,50M) sont un facteur favorable à leur formation.

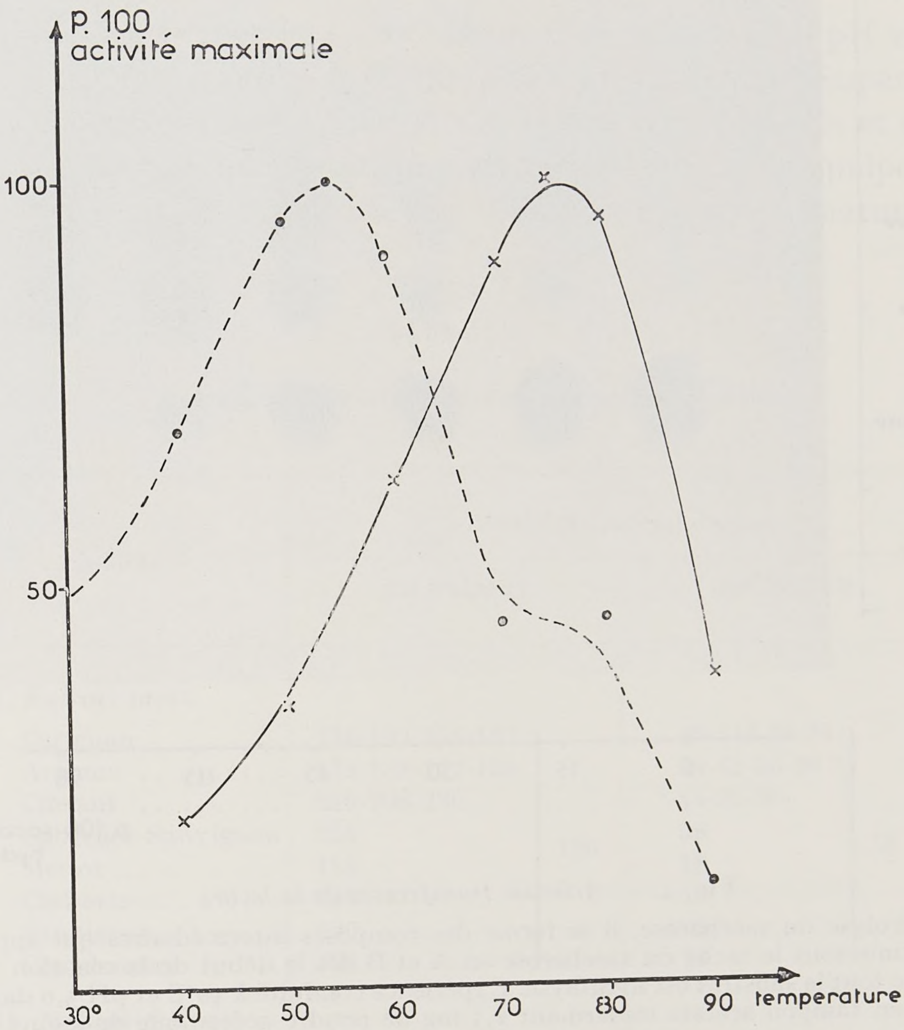



FIG. 3. — *Effet de la température sur les activités invertasiques du raisin et de la levure*
Activités du raisin ×———× et de la levure •---------•, mesurées à pH 4,0 pour le raisin et 4,5 pour la levure

Le raffinose est hydrolysé trois fois moins vite environ que le saccharose aussi bien par le matériel enzymatique du raisin que celui de la levure. Cette hydrolyse, suivie par chromatographie sur plaque de cellulose du mélange réactionnel, s'accompagne d'une augmentation concomitante de fructose et de mélibiose sans apparition de glucose et galactose.

Le maltose et le mélézitose, substrats de l'α-glucosidase et le mélibiose, substrat de l'α-galactosidase, ne sont hydrolysés ni par l'équipement enzymatique du raisin ni par celui de la levure après des temps d'incubation à 40°C de 9 heures dans des conditions expérimentales où la totalité du saccharose et du raffinose est hydrolysée.

Il ne fait donc pas de doute que les activités invertasiques de la levure et du raisin sont bien le fait d'une β-D-fructofuranoside-fructohydrolase.

Cependant l'hydrolyse d'arylglucosides et d'arylgalactosides par les poudres acétoniques de raisin et de levures (tabl. 1) témoigne de la complexité de leurs maté-

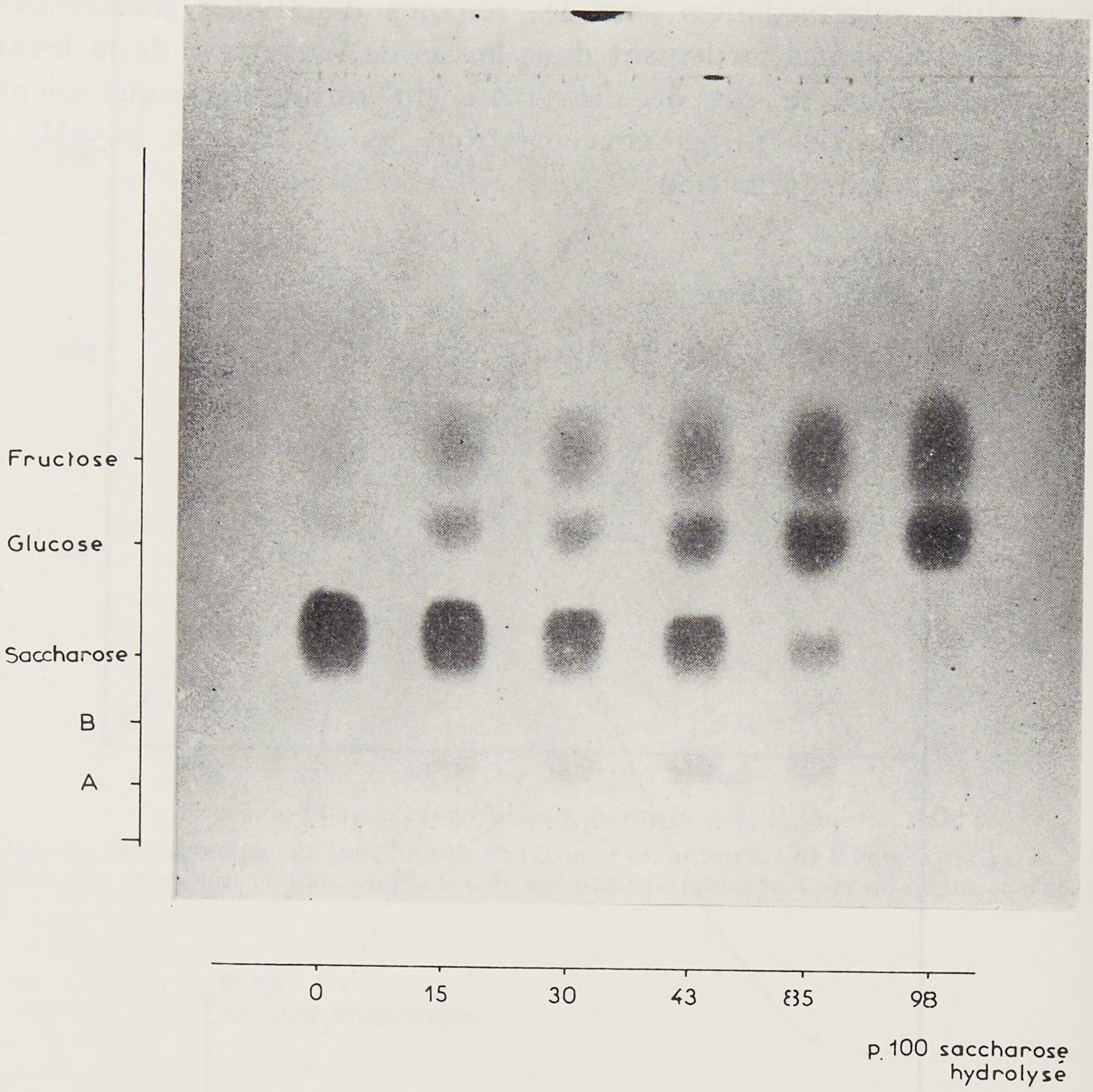



FIG. 4. — *Activités transférases de la levure*

Au cours de l'hydrolyse du saccharose, il se forme des composés intermédiaires qui apparaissent sur le chromatogramme sous la tache du saccharose en A et B dès le début de la réaction pour disparaître ensuite lorsque tout le substrat est hydrolysé. Expérience conduite à 40°C et pH 5,0 dans du saccharose 0,30M 0,02M en tampon acétate renfermant 1,5 mg de poudre acétonique de levure par ml.

TABLEAU I

*Activités du raisin et de la levure vis-à-vis d'arylglucosides et d'arylgalactosides*

| Substrats | Carignan | | Muscat d'Alexandrie | | | Levure | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *p*. nitrophényl-α-D-glucoside | 0,031 | 0,035 | 0 | 0 | 0,01 | 0,03 | 0,04 | 0,00 |
| *p*. nitrophényl-α-D-galactoside | 6,2 | 8,3 | 7,1 | | 11,2 | 0 | 0 | |
| *p*. nitrophényl-β-D-glucoside | 1,7 | 2,3 | 2,1 | | 2,4 | 5,8 | 1 | |
| *p*. nitrophényl-β-D-galactoside | 10,6 | 21,3 | 12,4 | | 13,3 | 0,2 | 0,01 | |

Activités exprimées en micromoles de nitrophénol libérées par 100 mg de poudre acétonique après 120 minutes d'incubation à 40°C des mélanges réactionnels 0,004M en substrat, 0,04M en tampon acétate pH 4,0 contenant des quantités de poudre acétonique de 22,5 mg/ml pour le raisin et 75 mg/ml pour la levure.

riels osidasiques. Ils renferment à côté de traces d'activités α-glucosidase, des activités α et β-galactosidase, β-glucosidase pour le raisin, des activités β-glucosidase et β-galactosidase pour la levure.

### B. — *Le potentiel invertasique du raisin et de la levure*

Il varie dans des proportions considérables en fonction du pH et de la température (fig. 2 et 3). Nous l'avons donc apprécié à un pH et une température d'intérêt œnologique c'est-à-dire à pH 3,5 et 30°C à la fois pour le raisin et pour la levure.

Le potentiel invertasique du raisin a été mesuré sur des jus pulpeux et limpides provenant de baies saines et pourries de différents cépages à maturité industrielle (tabl. 2).

TABLEAU 2

*Potentiel invertasique du raisin sain et pourri*

| Cépages | Activités par ml de jus | | | |
|---|---|---|---|---|
| | jus pulpeux | | jus limpide | |
| I. *Raisins sains* | | | | |
| Carignan | 196-192-246-192 | 196 | 34-118-98-84 | 56 |
| Aramon | 172-138-142-138 | | 34-62-56-20 | |
| Cinsaut | 210-208-230 | | 14-36-30 | |
| Cabernet-Sauvignon | 224 | | 38 | |
| Merlot | 158 | | 48 | |
| Clairette | 238 | | 40 | |
| Sauvignon | 220 | | 106 | |
| Chardonnay | 236 | | 74 | |
| II. *Raisins pourris* | | | | |
| Carignan | 114-146-126 | 122 | 32-24-6 | 22 |
| Aramon | 52-106-150-116 | | 28-6-20-6 | |
| Cinsaut | 126-150-134 | | 36-38-30 | |

Activités exprimées en micromoles de saccharose hydrolysées par ml de jus après 60 minutes d'incubation à 30°C et pH 3,5.

Il ne paraît pas y avoir de différences significatives entre les potentiels invertasiques des différents cépages testés ; la plus grande partie de ce potentiel, plus des deux tiers en moyenne, se trouve localisée dans la pulpe. Les raisins pourris ont deux fois moins d'activités que les raisins sains.

Des baies ont été prélevées à différents stades de développement, pesées et conditionnées sous forme de poudre acétono-alcooliques dont on a mesuré le poids de façon à rapporter les activités trouvées à la baie.

Les activités suivent le développement du grain et sont présentes dans le grain dès le premier prélèvement au stade herbacé ; les résultats rapportés à 100 grammes de baies, montrent que la baie s'enrichit peu en matériel enzymatique (fig. 5).

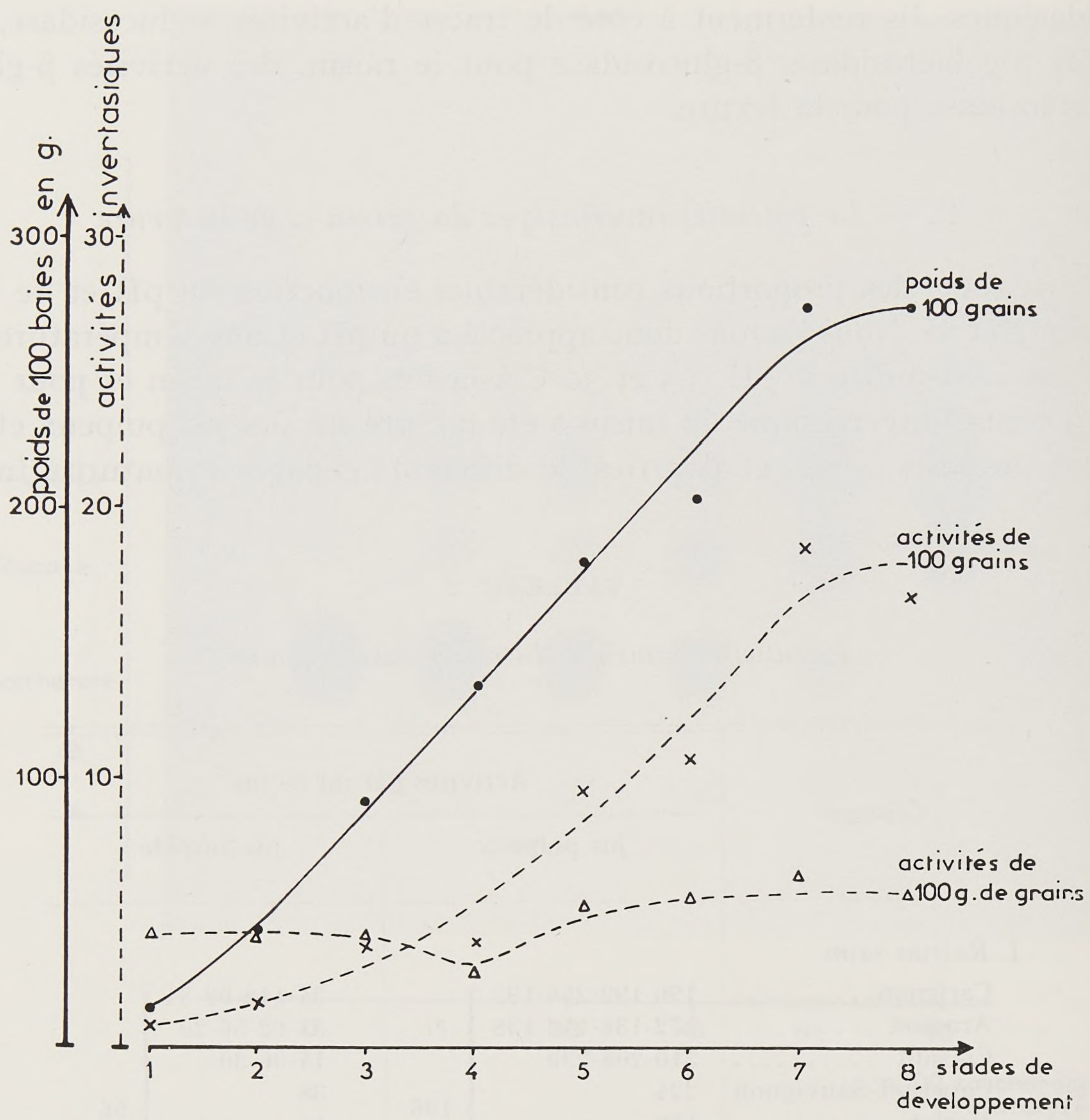



FIG. 5. — *Évolution des activités au cours du développement et de la maturation du raisin*

Les activités sont exprimées en millimoles de saccharose hydrolysées en 60 minutes à 30°C et pH 4,0.
Stades grains herbacés : 1 à 4 ; à véraison : 5 et 6 ; mûrs : 7 et 8

Le potentiel invertasique de la levure a été mesuré sur des levures cultivées soit sur des jus de raisin enrichis ou non en nutriments, soit sur des milieux synthétiques et les résultats rapportés à $100 \times 10^6$ cellules par ml, ce qui correspond à une population levurienne rencontrée dans la pratique œnologique (tabl. 3).

Le potentiel invertasique de la levure dépend du milieu de culture. Les levures cultivées sur milieu synthétique sont beaucoup plus riches en invertase que celles cultivées sur jus de raisin. L'addition à ces derniers de nutriments permet de multiplier par 4 ou 5 l'activité invertasique des levures mais sans atteindre le niveau d'activité des mêmes levures cultivées sur milieu synthétique.

Le glucose ne paraît pas avoir d'effet aux concentrations testées, le saccharose induit un supplément d'activité au contraire de l'éthanol qui, à la concentration de 9 p. 100, dans le milieu de culture, induit une forte diminution du potentiel invertasique des cellules.

Si on mesure les activités du milieu de culture en présence et en l'absence des cellules qu'il contient (tabl. 4), on constate que l'invertase de la levure diffuse très peu dans le milieu au cours du développement des cellules. Si on induit la production d'invertase dans les cellules par addition de saccharose dans le milieu de culture,

TABLEAU 3

*Potentiel invertasique de la levure*

| Milieux de culture | Activités de 100 × $10^6$ cellules |
|---|---|
| I. *Milieux synthétiques* | |
| *milieu de base* (1) *plus* | |
| Glucose 180 g/l | 79-76 |
| Glucose 20 g/l | 75-77-110 |
| Glucose 20 g/l plus éthanol 9 p. 100 | 8-10 |
| Saccharose 20 g/l | 116-120 |
| II. *Moûts de raisin* | |
| Moût n° 1 | 4,0 |
| Moût n° 2 | 2,0 |
| Moût n° 3 | 2,1 |
| Moût n° 4 | 6,0 |
| Moût n° 2 plus yeast extract 5 g/l $PO_4H(NH_4)_2$ 1 g/l | 11,0 |
| Moût n° 3 plus yeast extract 5 g/l $PO_4H(NH_4)_2$ 1 g/l | 8,0 |
| Moût n° 4 plus thiamine 200 mg/l $PO_4H(NH_4)_2$ 500 mg/l, saccharose 5 g/l | 50 |

Activités exprimées en micromoles de saccharose hydrolysées par 100 × $10^6$ cellules après 60 minutes d'incubation à 30°C et pH 3,5.

(1) La composition du milieu de base est donnée dans la partie expérimentale.

TABLEAU 4

*Localisation du potentiel invertasique de la levure*

| Milieux de culture | Activités du milieu de culture mesurées | | Activités fixées à la cellule p. 100 de l'activité totale |
|---|---|---|---|
| | en présence des cellules | en absence des cellules | |
| *Milieu de base* (1) *plus* | | | |
| Glucose 20 g/l | | | |
| Expérience n° 1 | 120 | 6,4 | 94 |
| n° 2 | 100 | 10,0 | 90 |
| n° 3 | 91 | 2 | 98 |
| n° 4 | 174 | 6 | 96 |
| n° 5 | 127 | 2 | 98 |
| Saccharose 20 g/l | 209 | 6 | 97 |

Activités exprimées en micromoles de saccharose hydrolysées par ml de milieu de culture après 60 minutes d'incubation à pH 3,5 et 28°C.

(1) La composition du milieu de base est donnée dans la partie expérimentale.

l'excrétion du matériel enzymatique n'est pas pour autant augmentée. L'invertase de la levure est donc pour l'essentiel à l'état lié, elle fonctionne à la manière d'une enzyme fixée.

Si on compare les résultats des tableaux 2 et 3, on constate que le potentiel invertasique de la levure est très faible comparativement à celui du raisin. A pH 3,5 et 30°C, un millilitre d'une population de $100 \times 10^6$ cellules par ml de *Saccharomyces cerevisiae* cultivée sur jus de raisin hydrolyse en 60 minutes de 2 à 6 micromoles de saccharose ; dans le même temps et les mêmes conditions, un millilitre de jus de raisin pulpeux en hydrolyse 150 à 250, ce qui revient à dire que le saccharose est hydrolysé 25 à 100 fois plus rapidement par le raisin que par la population levurienne qu'il peut renfermer dans les meilleures conditions de croissance cellulaire rencontrée en vinification.

### C. — *Hydrolyse du saccharose dans les moûts et pendant la fermentation alcoolique*

Nous avons cherché à nous rendre compte de la vitesse d'hydrolyse du saccharose dans les moûts et de la part qui pouvait revenir à la levure dans cette hydrolyse, dans des conditions se rapprochant de la pratique œnologique.

Du moût pulpeux (pH 3,1, sucre réducteur 175 g/l) a été additionné de 50 grammes de saccharose par litre et des parties aliquotes maintenues à 5°C, 25°C, 50°C, 70°C, c'est-à-dire à des températures de stockage, de fermentation et de thermovinification.

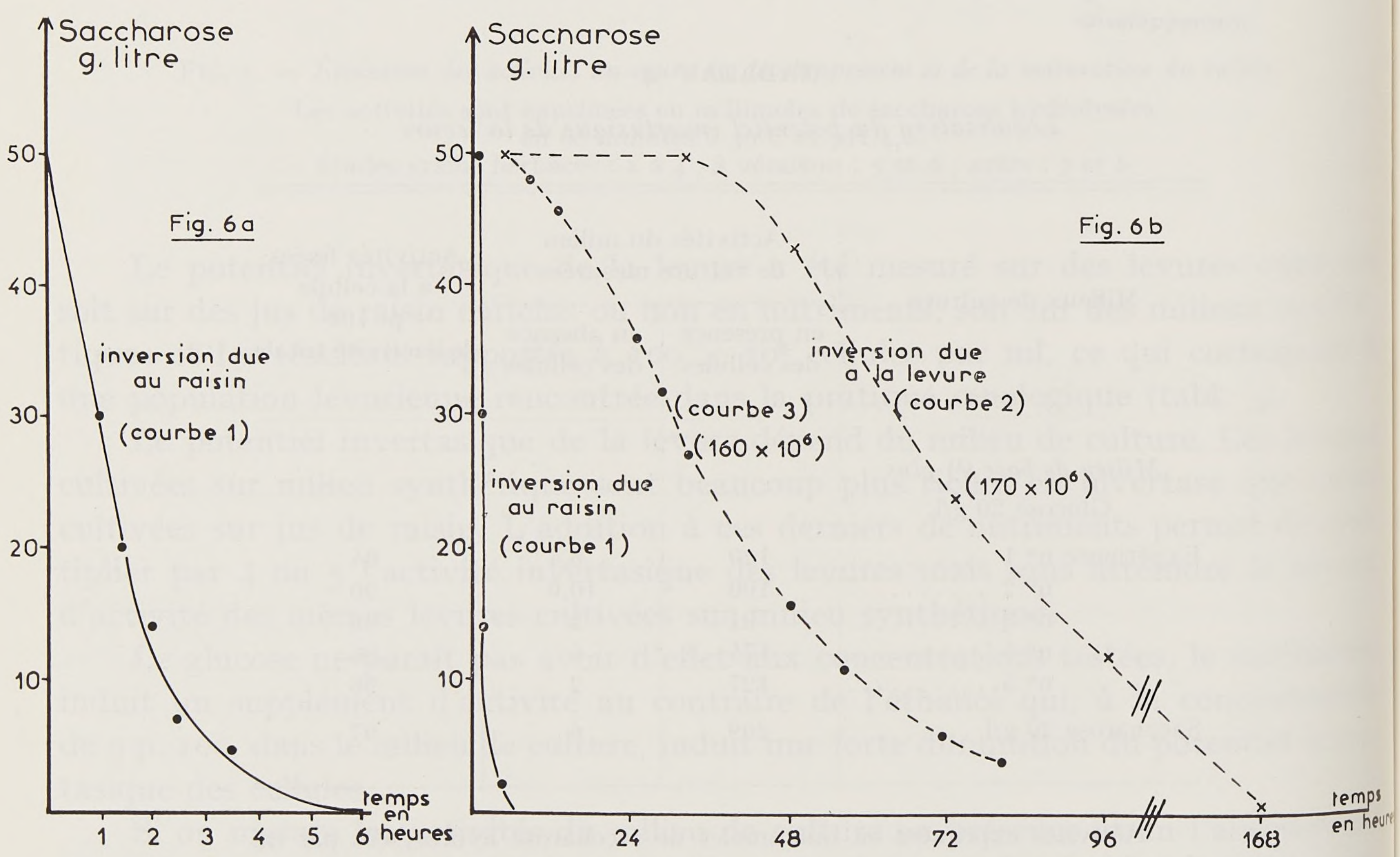



FIG. 6. — *Hydrolyse du saccharose dans les moûts et pendant la fermentation alcoolique*
Dans le moût (courbes 1, fig. 6 *a* et 6 *b*) ; pendant la fermentation alcoolique (fig. 6 *b*) de moût nature (courbe 2), enrichi en nutriments (courbe 3) et dont l'invertase endogène a été inactivée.

Tout le saccharose ajouté a disparu en 24 heures à + 5°C, en 3 heures à 25°C, en 30 minutes à 50°C, en 10 minutes à 70°C.

Si le moût est au préalable débarrassé de ses pulpes par centrifugation, l'hydrolyse d'une même quantité de saccharose ajoutée demande deux à trois fois plus de temps.

La vitesse d'hydrolyse du saccharose, très rapide au début, se ralentit par la suite à mesure que la concentration en saccharose diminue (fig. 6 *a*).

Si l'expérience est conduite après avoir ensemencé le moût maintenu à 28°C, à raison de $1 \times 10^6$ cellules de levure par ml, on constate que les 50 grammes de saccharose ajoutés sont hydrolysés le plus souvent bien avant que ne démarre la fermentation alcoolique. La part qui revient à la levure dans l'hydrolyse du saccharose dans les conditions de la pratique paraît donc très limitée, le plus souvent pratiquement nulle.

On peut s'en rendre compte encore en suivant l'hydrolyse du saccharose lors de la fermentation alcoolique d'un moût dont l'invertase naturelle a été au préalable inactivée par un traitement thermique.

Du moût porté à 100°C pendant 10 minutes puis ramené à 28°C est ensemencé à raison de $1 \times 10^6$ cellules de levure par ml après avoir été additionné de 50 grammes de saccharose par litre. A des intervalles de temps réguliers, la multiplication des levures est suivie en même temps que l'hydrolyse du saccharose jusqu'à sa disparition complète (fig. 6 *b*, courbe 2).

Après 72 heures, la population levurienne s'élève à $170 \times 10^6$ cellules par m et la moitié du saccharose a disparu et il faut attendre 7 jours pour que la totalité du saccharose soit hydrolysée.

Dans les mêmes conditions de pH, de température et de concentration en saccharose, l'invertase du raisin met six heures pour hydrolyser la même quantité de saccharose (courbe 1, fig. 6 *a* et 6 *b*).

Cependant la vitesse d'hydrolyse du saccharose par la levure dépend beaucoup des nutriments dont elle dispose. Ainsi si le moût de raisin précédent est additionné de thiamine (200 mg/l) et de phosphate diammonique (500 mg/l), la même quantité de saccharose est hydrolysée par, sensiblement, la même population levurienne ($160 \times 10^6$ cellules par ml), en deux fois moins de temps (fig. 6 *b*, courbe 3). Comme dans l'expérience précédente, les derniers grammes de saccharose sont longs à disparaître.

Parallèlement à l'hydrolyse du saccharose, nous avons suivi dans ces expériences le devenir de l'invertase du raisin et de la levure pendant et après la fermentation alcoolique.

L'invertase de la levure diffuse très peu dans le milieu au cours de la fermentation alcoolique et cependant l'hydrolyse du saccharose qu'il contient, bien que très ralentie en fin d'inversion, est totale (fig. 6 *b*, courbes 2 et 3) ; c'est donc que l'enzyme reste fixée à la cellule sur un site suffisamment accessible au substrat.

Après la fermentation alcoolique, on retrouve dans les lies l'essentiel du potentiel invertasique de la levure, lequel diminue ensuite lentement au cours du séjour prolongé des cellules dans le vin.

L'invertase du raisin fixée aux débris cellulaires de la baie est très stable pendant et après la fermentation alcoolique, à la différence de l'invertase libre dont la stabilité, très variable, dépend de facteurs qui demanderaient à être précisés. Au

total, le potentiel invertasique du vin après clarification à la fin de la vinification, correspond à 15-30 p. 100 du potentiel invertasique du moût d'origine.

Dans le tableau 5, nous avons rassemblé les résultats correspondants aux activités invertasiques trouvées dans des vins blancs, rosés et rouges de un an d'âge provenant de différentes coopératives de l'Hérault.

TABLEAU 5

*Potentiel invertasique des vins*

| Nature des vins | Activités par ml de vin | |
|---|---|---|
| Vins blancs | 20-24-25-56-85 | 42 |
| Vins rosés | 46-7-60-73 | |
| Vins rouges : | | |
| vinification traditionnelle | 10-8-2-8-10-20-26-3<br>8-22-1-2-3-4-7 | 9 |
| thermovinification | 1,0-10-25-5-9 | 10 |

Activités exprimées en micromoles de saccharose hydrolysées par ml de vin après 60 minutes d'incubation à pH 3,5 et 30°C.
Analyses faites sur des vins âgés de un an.

Le potentiel invertasique du vin, un an après son élaboration, représente 10 à 20 p. 100 environ de celui du raisin (tabl. 2), et il peut être très différent d'un vin à l'autre.

D'une manière générale, il est plus élevé dans les vins blancs et rosés que dans les vins rouges. La thermovinification par chauffage de la vendange 20 minutes à 65-70°C laisse dans les vins un potentiel invertasique aussi élevé que la vinification en rouge traditionnelle.

## D. — *Propriétés d'intérêt technologique*

*Action du $SO_2$, des tanins, de l'éthanol.*

Pour se rapprocher davantage des conditions de la pratique, l'action de ces effecteurs a été testée sur des jus pulpeux de raisin contenant donc à la fois l'invertase libre et liée aux débris cellulaires et sur des suspensions de levure plutôt que sur des préparations enzymatiques isolées de leur contexte cellulaire.

L'invertase du raisin est très résistante au $SO_2$, aux tanins, elle est par contre inhibée par l'éthanol (tabl. 6).

L'invertase de la levure dans sa forme liée aux cellules est également très résistante au $SO_2$ qui reste sans effet jusqu'à la dernière concentration testée de 0,1 p. 100 ; elle est inhibée par les tanins et l'éthanol.

TABLEAU 6

*Action de différents effecteurs sur l'invertase du raisin et de la levure*

| Nature et concentration de l'effecteur dans le mélange d'incubation | Activités p. 100 de l'activité du témoin | |
|---|---|---|
| | Invertase du raisin | Invertase de la levure |
| I. *Effecteur $SO_2$* | | |
| Témoin | 100 | 100 |
| $SO_2$ 0,01 p. 100 | 100 | 102 |
| 0,02 p. 100 | 96 | 99 |
| 0,10 p. 100 | 98 | 102 |
| II. *Composés tannoïdes* | | |
| Témoin | 100 | 100 |
| catéchine 1 g/l | 100 | 88 |
| 2 g/l | 88 | 68 |
| œnotanin 1 g/l | 101 | 71 |
| 2 g/l | 105 | 48 |
| tanins de bois 1 g/l | 98 | 60 |
| 2 g/l | 98 | 31 |
| III. *Éthanol* | | |
| Témoin | 100 | 100 |
| éthanol 5 p. 100 | 86 | 78 |
| 10 p. 100 | 67 | 66 |
| 20 p. 100 | 15 | 41 |

Activités mesurées sur des jus pulpeux ou des extraits de poudre acétonique de raisin, sur des suspensions de cellules de levure après 60 minutes d'incubation à pH 3,5 et 28°C pour la levure, à pH 4,0 et 50°C pour le raisin.

$SO_2$ = solution de métabisulfite de potassium U. C. B. ; catéchine Fluka ; œnotanin : grape tanin Newmark's ; tanin de bois : produit œnologique.

*Thermorésistance.*

Elle a été étudiée sur les invertases libres et liées du raisin et de la levure en prenant comme matériel enzymatique des jus de raisin limpides et pulpeux d'une part et des autolysats de levure et des suspensions de cellules dans leur milieu de culture d'autre part. Des essais ont également été réalisés sur le vin.

Des parties aliquotes de moûts pulpeux ou limpides, de vins, d'autolysats de levures ou de suspensions cellulaires tamponnés à pH 3,2 sont mises dans l'espace annulaire d'un échangeur de température baignant dans un bain-marie porté à la température de l'expérience. Aux différents temps, l'échangeur est sorti du bain-marie, plongé dans de la glace puis les activités invertasiques mesurées.

L'échangeur de température est constitué de deux tubes de verre concentriques, soudés

à une extrémité, délimitant un espace annulaire de 1,5 mm d'épaisseur dans lequel l'échantillon à traiter forme un film étroit présentant sur ses deux faces une grande surface de contact avec l'eau du bain-marie.

La figure 7 montre l'effet de la durée et de la température de chauffage sur l'activité des jus pulpeux et limpides.

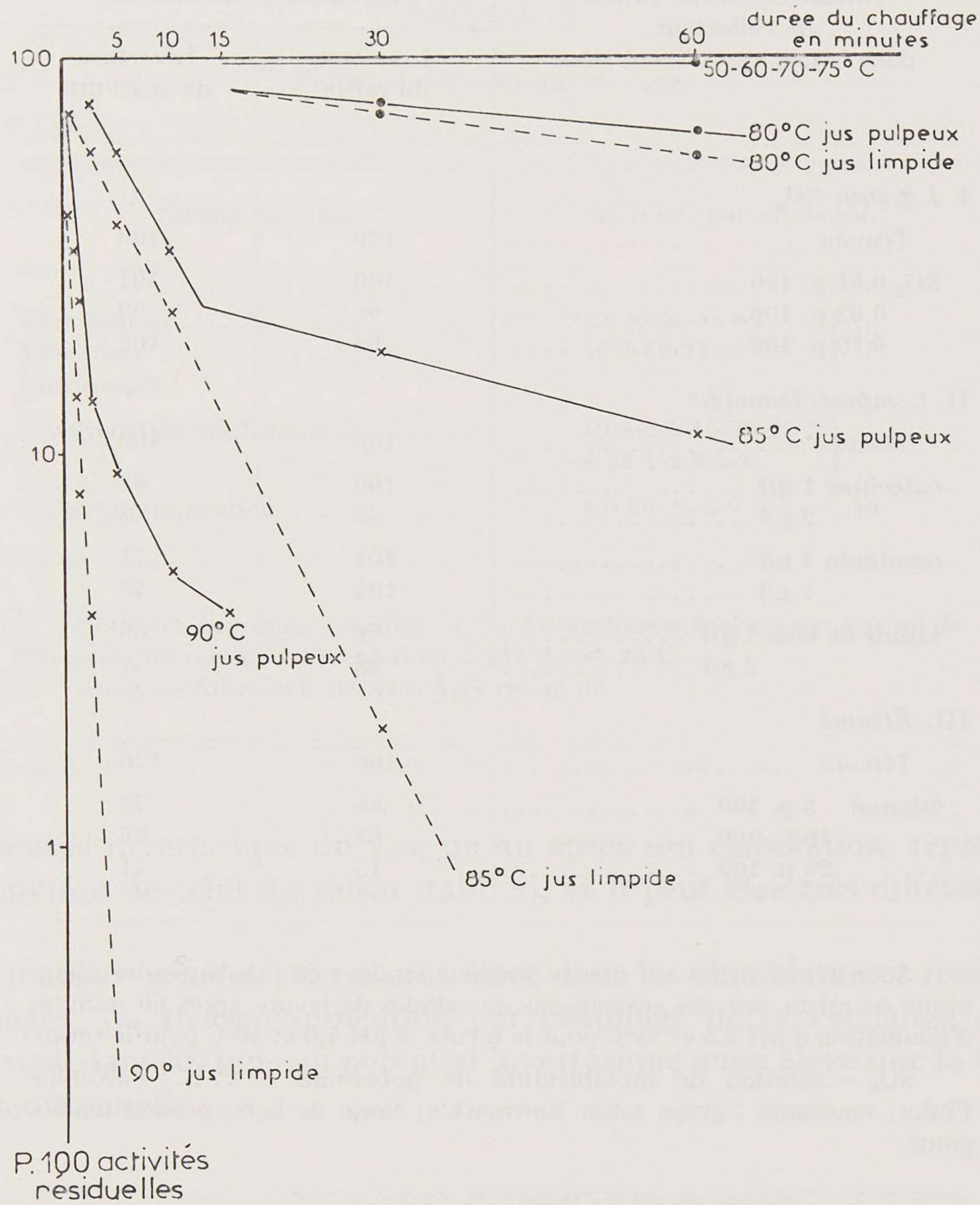



FIG. 7. — *Effet du temps et de la température de chauffage sur l'invertase du raisin*
Inactivation réalisée à pH 3,5 sur jus pulpeux et sur jus limpide

L'invertase du raisin, dans sa forme liée ou libre, est très résistante à la chaleur puisqu'après 60 minutes de chauffage elle ne perd pratiquement rien de son activité jusqu'à 75°C et qu'elle en possède encore environ les deux tiers à 80°C.

Au-delà de 80°C, des différences significatives apparaissent dans les vitesses d'inactivation de l'enzyme libre et liée, cette dernière se montrant plus résistante. La plus grande thermorésistance de l'enzyme liée peut expliquer les ruptures de pente des courbes d'inactivation observées à 85° et 90°C. Un chauffage à 95°C pendant 2 minutes laisse encore des quantités non négligeables d'activités dans les jus pulpeux et il faut pratiquement les porter à 100°C pendant 60 secondes pour obtenir

leur inactivation totale. Dans le vin, l'enzyme est beaucoup plus sensible à la chaleur puisqu'il suffit alors d'une exposition de 15 minutes à 70°C pour lui faire perdre plus de 50 p. 100 de son activité.

L'invertase de la levure est, quant à elle, beaucoup plus thermosensible ; elle perd 95 p. 100 de son activité par un chauffage de 5 minutes à 70°C, qu'elle soit dans sa forme liée ou soluble, c'est-à-dire que l'inactivation soit conduite sur des suspensions ou des autolysats.

Les températures critiques d'inactivation thermique de l'invertase du raisin se situent aux environs de 80-85°C dans les moûts et de 70°C dans les vins, celle de la levure aux environs de 55°C (fig. 8).

La durée de chauffage est de peu d'importance jusqu'à ces seuils d'inactivation thermique.

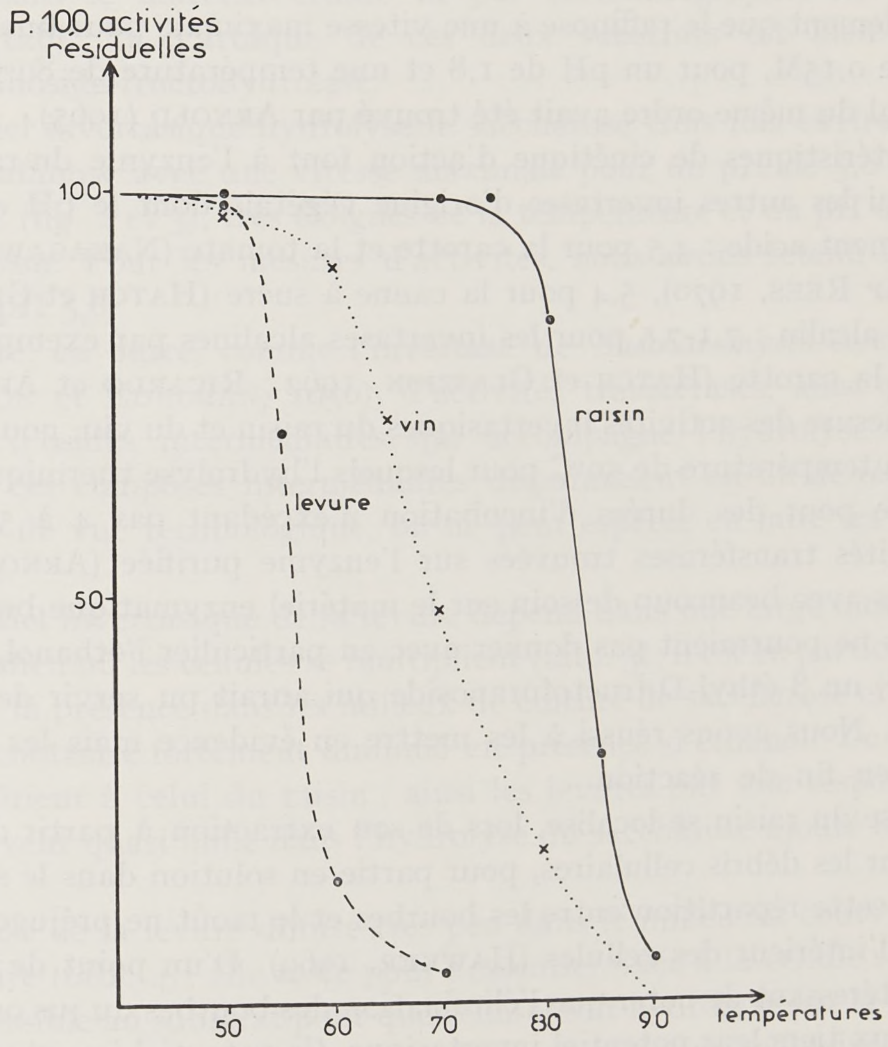



FIG. 8. — *Thermorésistance des invertases du raisin et de la levure*

Courbes d'inactivation thermique à pH 3,5 pour une durée de chauffage de 15 minutes pour le moût ●———●, pour le vin ×·······×, et de 5 minutes pour la levure ●--------●

## IV. — DISCUSSION. CONCLUSION

Le raisin possède un matériel enzymatique capable d'hydrolyser le saccharose et le raffinose mais non le maltose, le mélézitose et le mélibiose dans des conditions expérimentales où la totalité de deux premiers substrats est hydrolysée. L'attaque

du raffinose se fait en outre du côté du fructose sans apparition concomitante de galactose et de glucose.

C'est donc bien une β-D-fructofuranoside-fructohydrolase qui est la principale responsable de l'hydrolyse du saccharose par le raisin.

Cependant l'équipement du raisin en matériel osidasique ne se résume pas à la seule invertase. Il est plus complexe comme en témoigne l'attaque faible mais significative des *p*-nitrophényl-α et β-D-galactosides, du *p*-nitrophényl-β-D-glucoside ainsi que les traces d'activités vis-à-vis du *p*-nitrophényl-α-D-glucoside (tabl. 1). En ce qui concerne l'hydrolyse de ces arylglucosides, il est intéressant de noter que les *p*-nitrophényl-α-glucoside et α-galactoside révèlent des activités qui n'avaient pu être mises en évidence par les substrats naturels correspondants, le maltose et le mélézitose d'une part, le mélibiose d'autre part.

Le matériel invertasique brut du raisin hydrolyse le saccharose environ trois fois plus rapidement que le raffinose à une vitesse maximale pour une concentration en substrat de 0,15M, pour un pH de 1,8 et une température de 80°C (fig. 2 et 3). Un pH optimal du même ordre avait été trouvé par ARNOLD (1965).

Ces caractéristiques de cinétique d'action font à l'enzyme du raisin une place originale parmi les autres invertases d'origine végétale dont le pH optimal est en général faiblement acide : 4,5 pour la carotte et la tomate (NAKAGAWA *et al.*, 1972 ; RICARDO et AP REES, 1970), 5,4 pour la canne à sucre (HATCH et GLASZION, 1962) ou faiblement alcalin : 7,1-7,5 pour les invertases alcalines par exemple de la canne à sucre et de la carotte (HATCH et GLASZION, 1962 ; RICARDO et AP REES, 1970).

Pour la mesure des activités invertasiques du raisin et du vin, nous avons retenu le pH 4,0 et la température de 50°C pour lesquels l'hydrolyse thermique du substrat est négligeable pour des durées d'incubation n'excédant pas 4 à 5 heures.

Les activités transférases trouvées sur l'enzyme purifiée (ARNOLD, 1965) ont été recherchées avec beaucoup de soin sur le matériel enzymatique brut dans le but de voir si elles ne pourraient pas donner avec en particulier l'éthanol, accepteur du fructose libéré, un β-éthyl-D-fructofuranoside qui aurait pu servir de témoin de la chaptalisation. Nous avons réussi à les mettre en évidence mais les osides formés disparaissent en fin de réaction.

L'invertase du raisin se localise, lors de son extraction à partir du raisin frais, pour partie sur les débris cellulaires, pour partie en solution dans le suc vacuolaire (tabl. 2) mais cette répartition entre les bourbes et le moût ne préjuge en rien de sa localisation à l'intérieur des cellules (HAWKER, 1969). D'un point de vue technologique, il est intéressant de noter que l'élimination des bourbes du jus ou du vin réduit de plus des deux tiers leur potentiel invertasique. Ce potentiel invertasique est élevé et suffisant pour hydrolyser 50 grammes de saccharose ajoutés au moût en quelques heures à 28°C, c'est-à-dire le plus souvent avant l'intervention des levures (fig. 6 *a* et 6 *b*). L'invertase liée est stable durant la fermentation alcoolique, l'invertase en solution disparaît ou non suivant le moût mis en œuvre, comme si elle était l'objet d'une précipitation partielle et variable selon peut-être l'aptitude plus ou moins grande des moûts et des vins à se clarifier spontanément.

L'attaque du raisin par *Botrytis cinerea* s'accompagne d'une perte d'environ la moitié de son potentiel invertasique (tabl. 2), contrairement à ce qui se passe pour son potentiel protéolytique (CORDONNIER, DUGAL, 1968) et son potentiel phosphatasique (CORDONNIER, résultats non publiés). Cette perte d'activité induite par

*Botrytis cinerea*, dont on sait qu'il sécrète dans le raisin une polyphénoloxydase, est à rapprocher de l'inactivation de l'invertase de la levure par la tyrosinase de champignon (SIZER, 1948).

L'invertase du raisin est exceptionnellement stable à la chaleur puisqu'après 60 minutes de chauffage à 75°C elle ne perd pratiquement rien de son activité, mais, dans le vin, certains effecteurs dont l'éthanol réduisent dans des proportions importantes sa thermorésistance (fig. 7 et fig. 8).

Elle est également stable vis-à-vis du $SO_2$ et des tanins, mais sensible à l'éthanol dès la concentration de 5 p. 100 (tabl. 6)

La levure de vinification, *Saccharomyces cerevisiae*, possède aussi un équipement enzymatique capable d'hydrolyser le saccharose et le raffinose. En l'absence d'activités α-glucosidase nettes et d'activités α-galactosidase que nous n'avons pu mettre en évidence dans le matériel étudié ni par chromatographie ni par hydrolyse d'arylosides (tabl. 1), l'attaque de ces deux substrats est bien le fait d'une β-D-fructofuranoside-fructohydrolase.

Ce matériel invertasique hydrolyse le saccharose trois fois environ plus rapidement que le raffinose avec une vitesse maximale pour un pH de 5,0 et une température de 55°C (fig. 2 et 3), très éloignés de la température et du pH optimal de l'invertase du raisin. Pour les mesures d'activités, nous avons retenu la température de 50°C et le pH 5,0.

Il est doté, en outre, comme l'invertase de *Saccharomyces cerevisiae* d'autres origines (BACON et EDELMAN, 1950), d'activités transférases, ainsi qu'en témoigne la formation d'osides intermédiaires qui accompagne l'hydrolyse du saccharose (fig. 4), mais ces composés intermédiaires disparaissent en fin de réaction de sorte que, du point de vue technologique, on ne peut espérer en faire les témoins d'une chaptalisation.

Le potentiel invertasique de la levure dépend dans une large mesure de la composition du milieu où les cellules se multiplient (tabl. 3) ; il est en particulier fortement augmenté par la présence dans les milieux de culture de saccharose et de nutriments azotés ou au contraire fortement diminué en présence d'éthanol. De toute manière, il est très inférieur à celui du raisin ; ainsi les levures ont une responsabilité faible ou le plus souvent quasi nulle dans l'hydrolyse du saccharose ajouté lors de la vinification.

L'invertase de la levure diffuse très peu dans le milieu au cours de la multiplication cellulaire (tabl. 4) ; elle reste pour l'essentiel fixée à la cellule sur un site suffisamment accessible au substrat pour que celui-ci soit hydrolysé par la cellule (fig. 6 *b*, courbes 2 et 3) sans qu'il soit nécessaire de rompre le mur cellulaire ou de désorganiser la cellule par autolyse.

Ces résultats n'apportent pas d'information sur la localisation précise de l'invertase à l'intérieur de la cellule, mais ils sont à rapprocher de ceux de travaux réalisés sur des levures d'origines et (ou) d'espèces différentes qui ont montré que la sécrétion de l'invertase par les cellules intactes est très faible (SUTTON et LAMPEN, 1962 *a*) et que la plus grande partie de l'invertase liée se trouve à l'extérieur de la membrane cellulaire dans une région qui correspond à la paroi cellulaire, le reste étant intracellulaire et peu accessible au substrat (SUTTON et LAMPEN, 1962 *b*). La paroi cellulaire semble agir comme une barrière s'opposant au libre mouvement des molécules d'invertase. L'invertase, originellement intracellulaire, reste prison-

nière du réseau de la paroi cellulaire lors de sa sécrétion par la cellule (FRIIS et OTTOLENGHI, 1959).

Sur le plan technologique, l'invertase de *Saccharomyces cerevisiae* fonctionne donc dans la cellule à la manière d'une enzyme fixée et il est indispensable, si l'on veut mesurer correctement l'activité invertasique d'un vin, de le débarrasser des levures qu'il contient.

Dans sa forme liée aux cellules, l'invertase de *Saccharomyces cerevisiae* est très résistante au $SO_2$ comme l'invertase du raisin (tabl. 6) mais beaucoup plus sensible à la chaleur (fig. 8) ; elle est également inhibée par les tanins et l'éthanol (tabl. 6).

L'hydrolyse du saccharose par les invertases de la levure et du raisin, dans un mélange réactionnel simple, s'accompagne de la formation d'osides intermédiaires qui disparaissent lorsque tout le substrat est hydrolysé ; mais dans un milieu aussi complexe que le raisin qui renferme de nombreux accepteurs possibles du fructose libéré, la formation d'osides plus stables, lors de la vinification de vendanges enrichies en saccharose, n'est peut-être pas impossible. C'est, en tout cas, une voie de recherche de la chaptalisation qui mérite d'être explorée.

*Reçu pour publication en mai 1975.*

## SUMMARY


### THE INVERTASES OF THE GRAPE AND *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* : THEIR RESPECTIVE PARTICIPATION IN THE HYDROLYSIS OF SACCHAROSE ADDED IN VINIFICATION

Grapes contain a β-D-fructofuranoside-fructohydrolase which hydrolyzes saccharose with a maximum speed for a temperature of 80°C and a pH near to 1.8 ; the enzyme is exceptionally stable in heat, very resistant to $SO_2$ and sensitive to ethanol.

The grape's invertase potential, localized partly in the berry tissues and partly in the vacuolar sap, is very high and sufficient to hydrolyze the saccharose added to the must before the yeasts come into play. A *Botrytis cinerea* attack on the grape is accompanied by the loss of about half its invertasic potential.

*Saccharomyces cerevisiae* also has an invertase. It is endowed with transferase activities and hydrolyzes saccharose with a maximum speed for a pH of 5.0 and a temperature of 55°C. It is mainly linked to the cell on a site easily accessible to the substrate so that it functions as a fixed enzyme. The yeast's invertase potential depends to a great extent on the composition of the medium in which it grows, that of yeasts grown in grape must is always very low and almost negligible compared with the invertase potential of the grape.


## RESUMEN


### LAS INVERTASAS DE LA UVA Y DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE. SU PARTICIPACION RESPECTIVA EN LA HIDROLISIS DE LA SACAROSA AÑADIDA EN EL MOMENTO DE LA VINIFICACION

La uva posee una β-D-fructofuranosida-fructohidrolasa que hidroliza la sacarosa a una velocidad máxima para una temperatura de 80°C y un pH cercano de 1,8. La enzima es excepcionalmente estable al calor, sumamente resistente al $SO_2$ y sensible al alcohol.

El potencial invertásico de la uva, en parte localizado en los tejidos del fruto y en parte en el zumo vacuolar, es muy elevado, y de todos modos, suficiente para hidrolizar la sacarosa que es añadida al mosto antes de la intervención de las levaduras. El ataque de la uva por *Botrytis cinerea* queda acompañado de una pérdida de la mitad, aproximadamente, de su potencial invertásico.

*Saccharomyces cerevisiae* se encuentra también provisto de una invertasa, que está dotada de actividades transferentes y que hidroliza a la sacarosa a una velocidad máxima para un pH 5,0 y una temperatura de 55°C. Por lo que es esencial, se encuentra vinculada con la célula en un punto fácilmente accesible al substrato, de tal modo que su funcionamiento tiene lugar como si se tratase de una enzima fijada. El potencial invertásico de la levadura depende muy ampliamente de la composición del medio en que se desarrolla. El medio correspondiente a las levaduras cultivadas sobre mosto de uva es siempre muy reducido y casi insignificante el relación con el potencial invertásico de la uva.

## RIASSUNTO

### LE INVERTASI DELL'UVA E DI « SACCHAROMYCES CEREVISIAE » LA LORO RISPETTIVA PARTECIPAZIONE ALL'IDROLISI DEL SACCAROSIO AUMENTA LA VINIFICAZIONE

L'uva possiede un β-D-fruttofuranoside-fruttoidrolasi che idrolizza il saccarosio ad una velocità massima per una temperatura di 80°C e un pH di circa 1,8 ; l'enzima è eccezionalmente stabile al calore, molto resistente al $SO_2$, sensibile all'etanolo.

Il potenziale invertasico dell'uva, localizzato in parte nei tessuti della bacca e, in parte, nel succo vacuolare, è molto elevato e sufficiente per idrolizzare il saccarosio aggiunto al mosto prima dell'intervento dei lieviti. L'attacco dell'uva da *Botrytis cinerea* è accompagnato da una perdita di circa una metà del suo potenziale invertasico.

*Saccharomyces cerevisiae* possiede ugualmente un'invertasi. Essa è dotata di attività trasferasi e idrolizza il saccarosio ad una velocità massima per un pH di 5,0 ed una temperatura di 55°C. Essa è legata principalmente alla cellula su un sito facilmente accessibile al sostrato in modo che essa funziona come un enzima fissato. Il potenziale invertasico del lievito dipende in gran parte dalla composizione dell'ambiente nel quale essa cresce ; quello dei lieviti coltivati su mosto d'uva è sempre debolissimo e quasi trascurabile rispetto al potenziale invertasico dell'uva.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Andersen B., Thiesen N., Broe P. E., 1969. The transferring activity of fructo-furanosidase from yeast : a quantitative description. *Acta Chem. Scand.*, **23** (7), 2367-2374.

Arnold W. N., 1965. β-fructofuranosidase from grape berries. *Biochim. Biophys. Acta*, **110**, 134-137.

Arnold W. N., 1966 *a*. β-fructofuranosidase from grape berries. II. Solubilisation of a bound fraction. *Biochim. Biophys. Acta*, **128**, 124-129.

Arnold W. N., 1966 *b*. β-fructofuranosidase from grape berries. III. The identity of the soluble and bound fractions. *Biochim. Biophys. Acta*, **128**, 196-198.

Arnold W. N., 1966 *c*. A column method for enzymatic characterization of coarse cellular fractions : application to insoluble β-fructofuranosidase from grape. *Arch. Biochem. Biophys.*, **113**, 451-456.

Ashwell G., 1957. Colorimetric analysis of sugars ; in *Methods in Enzymology*, volume 3, 85-86. Academic Press, New York.

Bacon J. S. D., Edelman J., 1950. *Arch. Biochem.*, **28**, 467.

Bartfay Z., 1969. Papier chromatographische Untersuchung der Invertaseaktivität in Mosten und Weinen. *Mitt. Rebe u-Wein*, **19** (1), 25-26.

Berthelot M., 1860. Sur la fermentation glucosique du sucre de canne. *C. R. Acad. Sci.*, **50**, 980-984.

Cordonnier R., Dugal A., 1968. Les activités protéolytiques du raisin. *Ann. Technol. Agric.*, **17** (3), 189-206.

Fallot M. B., Michon L., 1900. Sur la diastase inversive du saccharose des vins blancs. *Rev. Vit.*, **14** (347), 141-144 ; (348), 171-181 ; (349), 197-201.

Friis J., Ottolenghi P., 1959. Localization of invertase in a strain of yeast. *C. R. Lab. Carlsberg*, **31**, 259-271.

Guichard Cl., 1954. Contribution à l'étude des glucides de la vigne et de certains fruits. *Rev. gén. Bot.*, **61** (719), 16-65 ; (720), 96-127.

Guimberteau G., Peynaud E., 1964. Recherche et estimation du saccharose ajouté aux moûts et aux vins à l'aide de la chromatographie sur papier. *Vitis*, **4**, 269-275.

Hatch M. D., Glaszion K. T., 1962. Sugar accumulation cycle in sugar cane. II. Relationship of invertase activity to sugar content and growth rate in storage tissue of plant growth in controlled environment. *Plant Physiol.*, **38** (3), 344-348.

Hawker J. S., 1969. Insoluble invertase from grapes : an artefact of extraction. *Phytochemistry*, **8**, 337-344.

Jaulmes P., Hamelle G., 1960. La recherche du sucrage des moûts. *Ann. Fals. Exp. Chim.*, **53**, 184-192.

Martinand M. V., 1900. Sur la présence de l'invertine ou sucrase dans le raisin. *C. R. Acad. Sci.* **231**, 808-810.

Myrbäck K., 1960. Invertase ; in *The Enzymes*, 2e Édit., Vol. 4, 379-396. Academic Press, New York.

Nakagawa H., Hashimoto T., Ogura N., Takehana H., 1972. Cell wall bound enzyme. Properties of β-fructofuranosidase bound to tomato cell wall. *Agr. Biol. Chem.*, **36** (5), 697-702.

Nelson N., 1944. Photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.*, **153**, 365-380.

Pallavicini C., 1966. Determinazione degli enzimi fenolasi, fosfatasi, proteinasi e saccharasi in 20 vini di diversa natura. *Riv. Vitic. Enol.*, **12**, 492-496.

Pallavicini C., 1967. Distribuzione degli enzimi fenolasi, fosfatasi, proteinasi e saccarasi nelle parti constituenti gli acini di 4 uve e nei vini provenienti dalle uve stesse. *Ind. Agrarie*, **5**, 603-606.

Pallavicini C., 1971. Proteine solubili e isoenzimi della perossidasi, fosfatasi acida, amilasi, invertasi, fenolasi, esterasi e catalasi delle bucce e dei succhi di sei uve. *Ind. Agrarie*, **9**, 301-310.

Ricardo C. P. P., Ap Rees T., 1970. Invertase activity during the development of carrot roots. *Phytochemistry*, **9**, 239-247.

Sizer T. W., 1948. The inactivation of invertase by tyrosinase. *Sciences*, **108** (24), 335-336.

Sutton D. D., Lampen J. O., 1962 *a*. Localization of sucrose and maltose fermenting systems in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta*, **56**, 303-312.

Sutton D. D., Lampen J. O., 1962 *b*. Invertase secretion and sucrose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* protoplasts. *Biochim. Biophys. Acta*, **58**, 294-302.

Swanson C. A., El-Shishiny, 1958. Translocation of sugars in the *Concord* grape. *Plant Physiol.*, **33**, 33-37.

Tarantola C., 1950. L'invertasi nei vini. *Riv. Vitic. Enol.*, **3**, 229-232 et 247-253.

Weber O., 1972. Über die in Wein trauben, traubensäften und rosinen vorkommende Saccharose. *Mitt. Rebe u. Wein.*, **22**, 91-100.

*Ann. Technol. agric.*, 1975, **24** (2), 193-203.

# RELATIONS ENTRE LE pH ET LA MICROFLORE DES VIANDES HACHÉES DE BOVINS

J. LABADIE, Jeanne FOURNAUD* et B. L. DUMONT*

*Laboratoire de Microbiologie,*
*Centre de Recherches de Clermont-Ferrand, I. N. R. A.,*
*Theix, Saint Genès Champanelle, 63110 Beaumont*
* *Laboratoire de Recherches sur la Viande,*
*Centre national de Recherches zootechniques, I. N. R. A.,*
*78350 Jouy en Josas*

## RÉSUMÉ

L'acidification des viandes hachées de bovins (bœuf et veau) entraîne un ralentissement dans la croissance de la microflore dominante au cours de 14 jours de conservation à +2°C, +4°C. Ce phénomène est particulièrement marqué pour les viandes hachées de pH initiaux égaux ou inférieurs à 5,2 dans le cas d'adjonction d'acide lactique et à 5,4 dans le cas d'acide chlorhydrique. Les pH s'élèvent plus ou moins rapidement et fortement au cours du stockage selon l'anion présent. La composition de la flore dominante dépend du pH initial et évolue en fonction du pH résultant de l'action de cette flore sur la viande et l'acide ajouté dans le cas de l'ion lactate. Les levures dominent tant que le pH reste inférieur ou égal à 5,4 tandis que les *Pseudomonas* se multiplient lorsque le pH atteint 5,4 ou est supérieur. La couleur de la viande vire au grisâtre en surface. Néanmoins l'aspect de la viande ne peut *a priori* faire rejeter l'acidification comme procédé bactériostatique.

Mots clés : *bovin, viande hachée, microflore, conservation.*

La multiplication des micro-organismes dépend en grande partie des conditions physico-chimiques de l'environnement. Ainsi, température, potentiel d'oxydo-réduction, humidité, pH, sont autant de facteurs qui gouvernent le développement des espèces microbiennes dans les viandes fraîches. On sait, par exemple, que les basses températures possèdent la propriété de ralentir la prolifération des micro-organismes et cette caractéristique est mise à profit dans de nombreux procédés de conservation qui utilisent le froid comme agent bactériostatique. Seule elle permet, en particulier, de maintenir les viandes dans un état propre à la consommation pendant un temps qui, en général, est relativement court, de quelques jours pour un morceau de viande à 2 ou 3 semaines en moyenne pour une carcasse.

Aussi, pour prolonger cette durée de conservation, il serait intéressant de mettre au point des procédés complémentaires capables vers 0°, +4°C de restreindre le développement microbien inévitable à terme.

INGRAM (1948) observe que certains pH sont défavorables à la croissance des bactéries contaminant les viandes. GIBBONS et ROSE (1950) établissent, à l'aide de souches isolées de viande de porc, que le pH détermine la composition du mélange des espèces mises en culture. Aussi modifier le pH paraît être une technique relativement simple à envisager pour allonger le délai de conservation.

Le choix de l'acide utilisé pour abaisser le pH ne peut être indifférent. ERICKSON et FABIAN (1942) montrent qu'à quantité égale dans du bouillon de culture l'acide lactique est plus bactéricide que les acides acétique et citrique. Par contre, à pH identique, l'acide acétique est supérieur aux acides lactique et citrique. Des travaux plus récents (RHOADES et SHORT, 1971 ; REYNOLDS et CARPENTER, 1974) retiennent cette dernière observation et étudient la sensibilité des bactéries à l'acide acétique. A la suite des résultats obtenus par REYNOLDS et CARPENTER, NAUMANN et BALASUNDARAM (1974) traitent leur viande en expérience avec des solutions d'acide acétique à 57°C pour en diminuer la contamination superficielle initiale.

Il est souhaitable, en technologie de la viande, de développer l'étude des relations existant entre pH et flore microbienne, pour essayer de mieux maîtriser la conservation des produits carnés. Le problème est à considérer à la fois dans le cas des viandes en morceaux (au sein de la masse musculaire), mais aussi, et peut-être même d'abord, dans le cas des hachis qui sont, sous des formes variables et dans des buts très divers, largement employés en technologie carnée. D'autre part, les propriétés bactéricides de l'acide lactique ne doivent pas être négligées. En effet cet acide, formé à partir du glycogène musculaire, détermine le pH de la viande et l'ion lactate est un métabolite normal du muscle.

La présente étude concerne les conséquences de l'acidification de la viande hachée à l'aide de l'acide lactique. Ce dernier est comparé à un acide minéral (HCl) pour préciser, à un pH donné, l'influence de l'anion sur le devenir microbien et ce, dans la gamme de pH de 5,0 à 6,2.

## MATÉRIEL ET MÉTHODES

### 1. — *Préparation des échantillons*

On emploie quatre pièces de tende de tranche (deux de bœuf, deux de veau) prélevées dans la masse du muscle *Semi membranosus* de carcasses d'animaux ayant subi une maturation à +4°C de trois jours pour les veaux et de sept jours pour les bœufs. Chaque morceau pesant 1,7 kg environ est haché deux fois dans un hachoir électrique puis est fractionné en sept parties identiques (250 g environ) qui sont introduites dans des béchers recouverts de papier sulfurisé stérile. Le pH des quatre morceaux est de 5,8 au moment de la mise en œuvre.

Les échantillons sont amenés aux différents pH (variation de 0,2 unité) dans les limites de la gamme retenue pour cette étude (5,0-6,2) par addition d'acide lactique (10 p. 100) ou chlorhydrique (10 p. 100) ou d'une base (hydroxyde de sodium 10 p. 100). Pendant et après l'ajustement au pH désiré, on homogénéise avec une spatule stérile. Le pH de l'échantillon à ce moment sera considéré dans la suite de l'étude comme pH initial ($pH_0$).

Les viandes hachées sont stockées en chambre froide à +2°, +4°C. Les prélèvements pour analyses microbiologiques (4 à 10 g) sont effectués avant acidification et aux 2$^e$, 4$^e$, 7$^e$, 9$^e$, 12$^e$ et 14$^e$ jours de conservation. Chaque prélèvement est broyé à l'aide d'un homogénéisateur (Ultra-Turrax) dans le diluant I décrit par RAIBAUD *et al.* (1966). Ce diluant de pH 7,6 se compose de 0,5 p. 100 de peptone (Evans), 1,0 p. 100 de tryptone (Difco) et 0,5 p. 100 d'extrait de viande (Merck).

2. — *Analyses microbiologiques*

On utilise la technique des dilutions décimales avec ensemencements en milieux gélosés. Les dénombrements sont effectués en boîtes de Pétri (aérobiose) et en tubes de 8 × 400 (anaérobiose) selon une technique décrite par FOURNAUD *et al.* (1973).

a) *Milieux.*

La flore totale aérobie et anaérobie est dénombrée dans le milieu TVG5P (FOURNAUD *et al.*, 1973) qui renferme 1 p. 100 de protéose peptone n°3 (Difco), 0,5 p. 100 tryptone (Difco), 1 p. 100 extrait de viande (Merck), 0,5 p. 100 glucose (Prolabo), 0,002 p. 100 pourpre de bromocrésol (Touzart et Matignon), 1 p. 100 gélose (Touzart et Matignon). Le pH du milieu avant stérilisation est de 7,4-7,5. Les micrococoques sont dénombrés sur milieu de CHAPMAN (1945), les *Pseudomonas* et les entérobactéries sur milieu DPTS (FOURNAUD *et al.*, 1973). Ce dernier contient : désoxycholate de sodium (Difco) 0,1 p. 100, tryptone (Difco) 1,0 p. 100, peptone (Evans) 1,5 p. 100, safranine (Eastman Kodak) 0,002 p. 100, gélose (Touzart et Matignon) 1 p. 100. Le pH avant stérilisation est amené à 7,4-7,5. Tous ces milieux sont incubés à 22°C pendant 7 jours. Nous recherchons également la flore totale psychrotrophe (milieu TVG5P) par incubation à +2°, +4°C pendant 3 semaines.

b) *Identification.*

L'identification est réalisée selon le *Bergey's manual of determinative bacteriology* (7e édition).

c) *Interprétation des résultats.*

Les numérations sont exprimées par le logarithme décimal du nombre de micro-organismes par gramme. En cas d'essais répétés, la numération moyenne est établie à partir des logarithmes décimaux des diverses numérations.

## RÉSULTATS

Dans nos conditions expérimentales, le devenir microbien est, pour un pH donné, identique dans les viandes hachées de bœuf et de veau. Aussi les phénomènes décrits ci-après représentent les moyennes des observations faites sur les deux types de viande.

### *Influence du pH initial sur l'évolution de la flore dominante et du pH des viandes*

L'évolution de la flore dominante diffère selon le pH initial ($pH_0$) de la viande (fig. 1). Deux types de croissances microbiennes apparaissent : l'un pour les $pH_0$ inférieurs ou égaux à 5,4, l'autre pour les $pH_0$ supérieurs à 5,4.

Si le $pH_0$ est inférieur ou égal à 5,4 on note, quel que soit l'acide employé, une phase de latence de 48 heures. Dans les viandes acidifiées par l'acide chlorhydrique, le taux de multiplication se montre modéré et il varie dans le même sens que le $pH_0$. Par contre, dans le cas de l'acide lactique, la croissance microbienne est plus importante que précédemment, surtout dans les viandes de $pH_0$ égal à 5,0.

Pour les $pH_0$ supérieurs à 5,4, la phase de latence, si elle existe, dure moins de 2 jours et la multiplication bactérienne se montre relativement rapide puisque le nombre de micro-organismes dépasse 10 millions par gramme après 7 jours de conservation. Les vitesses de croissance pour les différents $pH_0$ des viandes acidifiées à l'acide lactique sont si proches les unes des autres qu'il paraît fort difficile de les

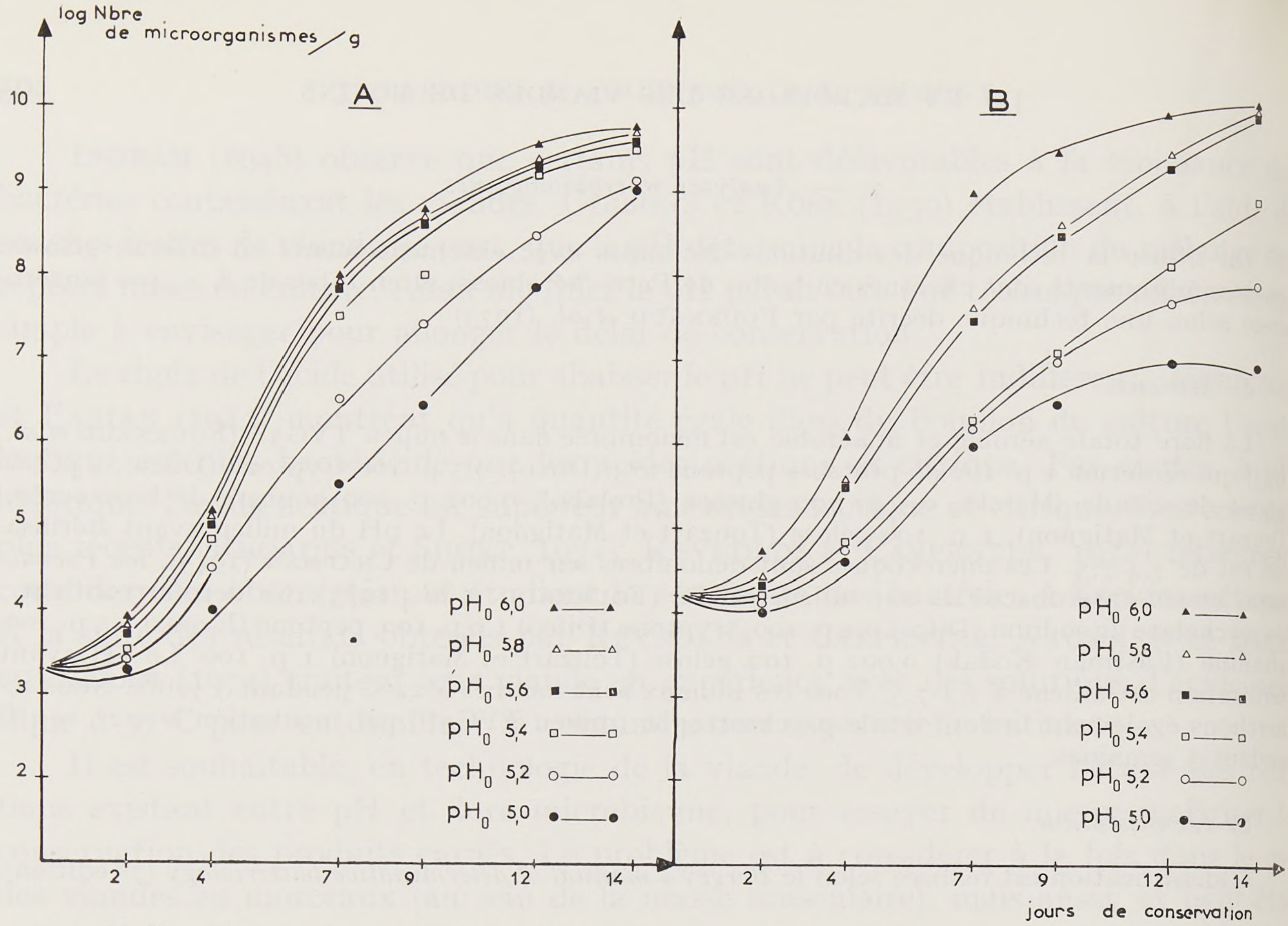



FIG. 1. — *Évolution, au cours d'une conservation à +2, +4°C, de la microflore totale de viandes hachées de bœuf et de veau amenées à différents pH*

A : échelle de pH inférieurs à 6,0 réalisée à l'aide d'acide lactique
B : échelle de pH inférieurs à 6,0 réalisée à l'aide d'acide chlorhydrique

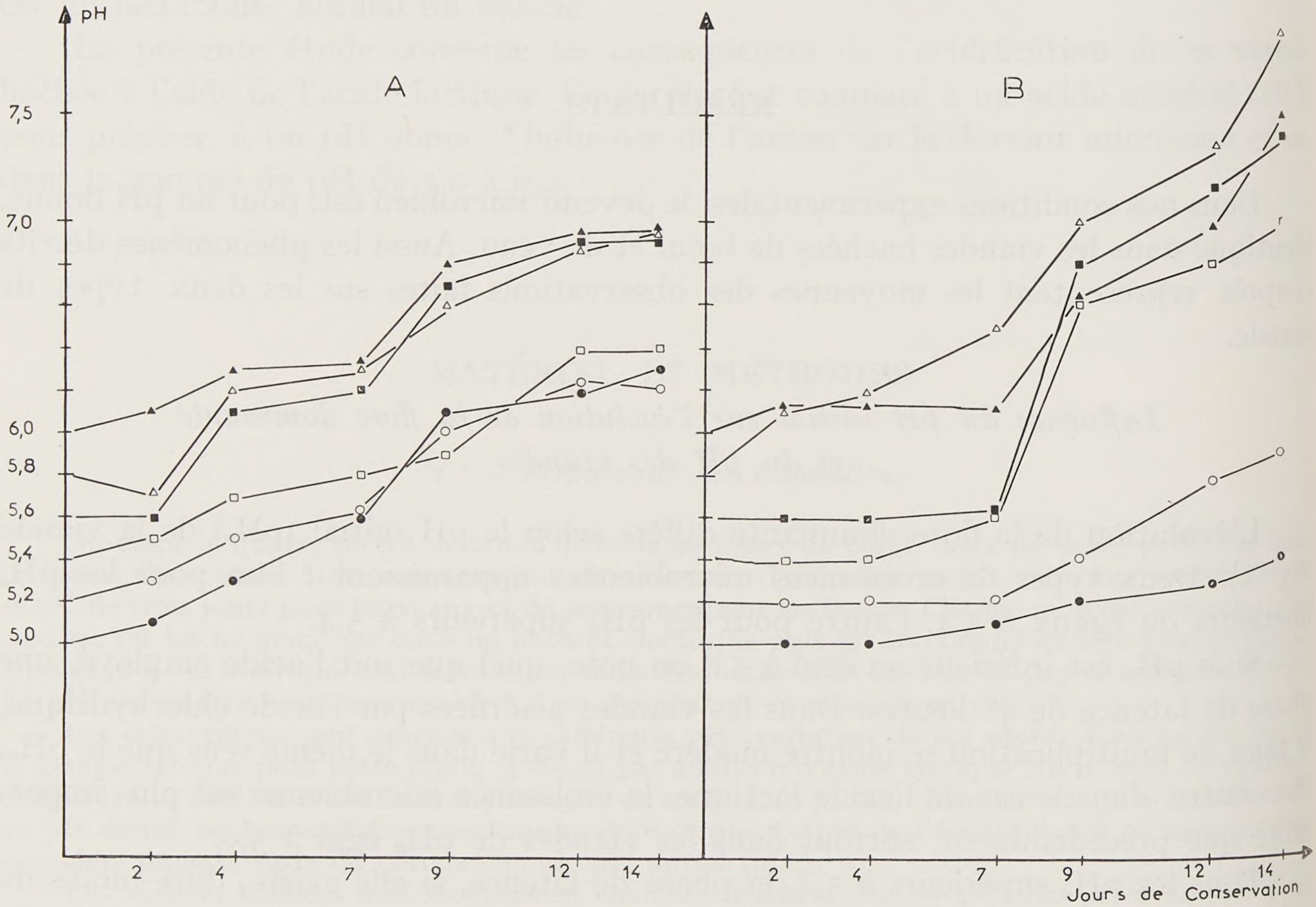



FIG. 2. — *Évolution au cours d'une conservation à +2, +4°C du pH de viandes hachées de bœuf et de veau amenées initialement à différents pH*

A : Échelle des pH inférieurs à 6,0 réalisée à l'aide d'acide lactique
B : Échelle des pH inférieurs à 6,0 réalisée à l'aide d'acide chlorhydrique

● $pH_0$ 5,0 ■ $pH_0$ 5,6
○ $pH_0$ 5,2 △ $pH_0$ 5,8
□ $pH_0$ 5,4 ▲ $pH_0$ 6,0

séparer. En d'autres termes, la présence d'acide lactique aux quantités correspondantes à des $pH_0$ supérieurs à 5,4 n'influe guère sur le développement microbien. Au contraire, avec l'acide chlorhydrique, on observe de nettes différences dans les vitesses de multiplication entre les viandes de $pH_0$ 6,0 et celles de $pH_0$ 5,6-5,8 pour lesquelles le développement microbien est moindre, tout en restant à un niveau supérieur à celui des viandes de $pH_0$ égal ou inférieur à 5,4.

Les pH ne demeurent pas stables au cours de la conservation, mais s'élèvent plus ou moins fortement en fonction du temps (fig. 2). Pour les viandes additionnées d'acide lactique, la variation du pH prend place dès le deuxième jour et se poursuit régulièrement tandis qu'il faut attendre 7 jours pour les viandes acidifiées par l'acide chlorhydrique et dont le $pH_0$ est inférieur ou égal à 5,6. Après 14 jours de conservation, pour un $pH_0$ identique, égal ou supérieur à 5,4, le pH des viandes additionnées d'acide chlorhydrique est supérieur à celui des viandes additionnées d'acide lactique. Le résultat est inverse pour les viandes de $pH_0$ de 5,0 et de 5,2.

*Évolution de différentes populations microbiennes de la flore dominante aux $pH_0$ inférieurs ou égaux à 5,4*

La flore dominante a initialement la composition suivante :

| | p. 100 |
|---|---|
| lactobacilles | 49 |
| microcoques et staphylocoques | 49 |
| *Pseudomonas* | < 1 |
| levures | < 1 |
| entérobactéries | < 1 |
| *Microbacterium* | < 1 |
| *Arthrobacter* | < 1 |

Après 4 jours de stockage, la flore se limite aux quatre premiers groupes microbiens.

La population des lactobacilles, microcoques et staphylocoques dans la flore dominante diminue au cours du temps (fig. 3). Cependant leur évolution dépend, en partie, de l'acide utilisé. En présence d'acide lactique, leur nombre, au cours des 7 premiers jours de conservation, reste sensiblement stable dans les viandes de $pH_0$ égal à 5,4 ou décroît légèrement dans celles de $pH_0$ égal à 5,0. Pendant ce même laps de temps, la flore totale augmente. Aussi, leur population par rapport à cette flore totale, de 98 p. 100 au temps initial pour l'ensemble de ces genres bactériens, tombe à 75 p. 100 au deuxième jour, 35 p. 100 au quatrième jour, et à 20 p. 100 au septième jour de conservation pour $pH_0$ de 5,4 et à 50, 40 et 30 p. 100 respectivement pour $pH_0$ de 5,0. Après une semaine de stockage, ces bactéries se multiplient parallèlement à la flore dominante, mais leur pourcentage reste peu élevé, du même ordre de grandeur qu'au septième jour. Elles constituent alors une flore relativement sous-dominante. Dans les viandes additionnées d'acide chlorhydrique, on assiste pour les $pH_0$ de 5,4 au même phénomène que précédemment. Mais à $pH_0$ de 5,0, ces bactéries disparaissent totalement de la flore dominante après 4 jours de conservation (fig. 3).

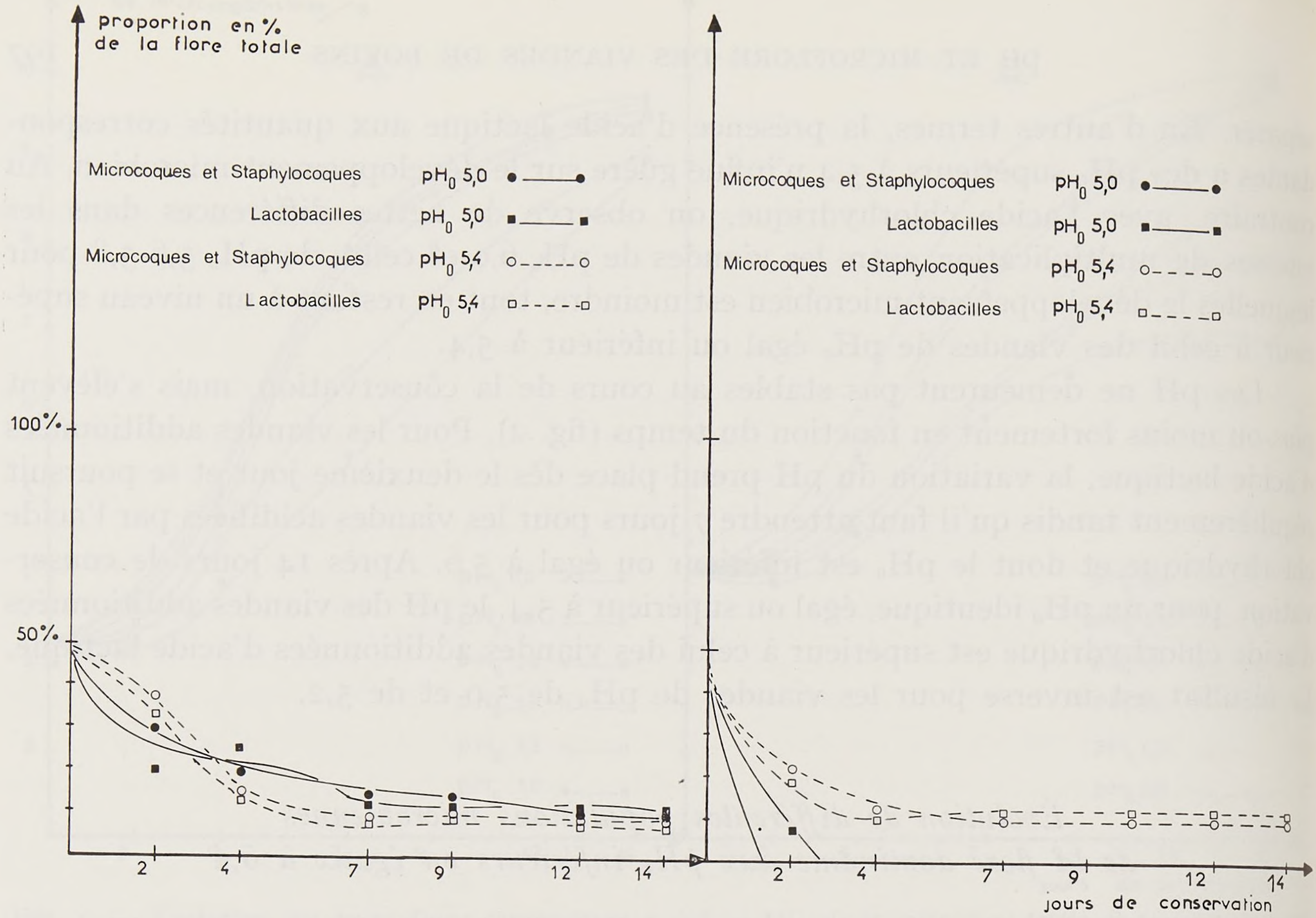



FIG. 3. — *Évolution des lactobacilles et des microcoques et staphylocoques selon le pH initial*

A : viande hachée additionnée d'acide lactique
B : viande hachée additionnée d'acide chlorhydrique

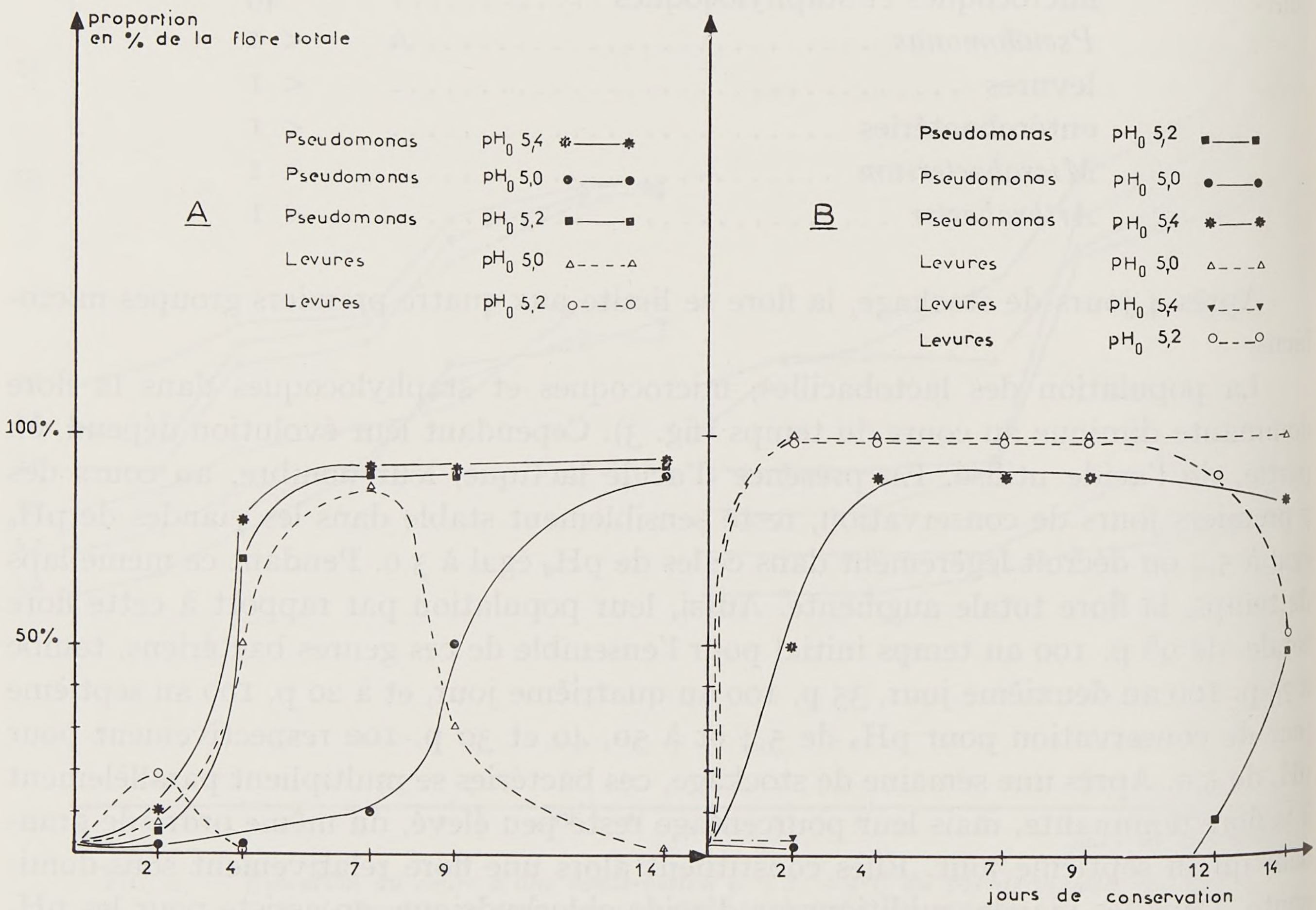



FIG. 4. — *Évolution comparée des levures et des Pseudomonas dans de la viande hachée de bœuf et de veau, conservée à +2, +4°C, en fonction du pH initial* ($pH_0$ inférieur à 5,5)

A : viande hachée additionnée d'acide lactique
B : viande hachée additionnée d'acide chlorhydrique

Les populations de levures et de *Pseudomonas* évoluent de façon complètement différente par rapport aux bactéries précédentes. On observe une très forte multiplication ou une disparition totale. De plus la nature de l'acide joue un rôle beaucoup plus important sur le devenir de ces deux groupes microbiens qui constituent la flore dominante.

En présence d'acide chlorhydrique, les *Pseudomonas* disparaissent dès le second jour de conservation dans les viandes de $pH_0$ de 5,0. La totalité de la flore dominante est alors constituée par les levures (fig. 4). Pour les viandes de $pH_0$ de 5,4 le phénomène est inverse : les levures sont éliminées au deuxième jour, tandis que les *Pseudomonas* forment la presque totalité de la flore dominante (90 p. 100) dès le quatrième jour (fig. 4). Dans les viandes de $pH_0$ de 5,2, on assiste à un autre phénomène : les *Pseudomonas* ne sont plus dénombrés à partir du deuxième jour de conservation comme dans le cas des viandes de $pH_0$ 5,0 mais réapparaissent au douzième jour lorsque le pH de la viande atteint et dépasse 5,4. Ce même douzième jour, les levures qui, depuis le deuxième jour, formaient 90 p. 100 de la flore totale, commencent alors à diminuer fortement.

L'acide lactique, quant à lui, favorise la croissance des *Pseudomonas*. Si le $pH_0$ de la viande est de 5,0, leur proportion dans la flore dominante devient importante dès le neuvième jour (50 p. 100) et atteint 80 p. 100 au quatorzième jour ; le nombre de levures passe par un maximum au septième jour (80 p. 100) puis décroît (fig. 4). Dans les viandes de $pH_0$ de 5,2, les évolutions se déroulent plus rapidement : les *Pseudomonas* représentent 70 p. 100 de la flore dominante au quatrième jour et 85 p. 100 au septième jour tandis que les levures ne sont plus dénombrées à partir du quatrième jour.

Parallèlement à l'évolution des micro-organismes, on observe que la viande devient grisâtre en surface et que cet aspect se maintient tout au long de la conservation. Par contre, dans la masse, la teinte reste rouge. Au bout de quelques jours (4 à 7), on note l'apparition d'odeurs agréables rappelant celle de la farine fraîche. Dans les viandes additionnées d'acide lactique apparaissent ensuite des odeurs aromatisées.

### *Évolution des différentes populations microbiennes de la flore dominante aux $pH_0$ supérieurs à 5,4*

La flore dominante des viandes de $pH_0$ supérieurs à 5,4 se compose seulement de trois types de populations bactériennes. L'évolution des diverses populations microbiennes de la flore dominante est semblable, quel que soit le $pH_0$ étudié. Aussi sur la figure 5, seules les courbes obtenues pour $pH_0$ égal à 6,0 sont représentées. Lactobacilles, microcoques et staphylocoques se multiplient en cours de conservation mais leur proportion dans la flore dominante diminue constamment au cours du temps (fig. 5). La vitesse de croissance des *Pseudomonas* est beaucoup plus rapide. Ils constituent alors plus de la moitié de la flore dominante dès le quatrième jour de conservation et 90 p. 100 au neuvième jour. La viande se recouvre, après 4-7 jours, d'un enduit visqueux dû aux *Pseudomonas*. Elle dégage, en outre, pendant les premiers jours, des odeurs fruitées qui ensuite deviennent désagréables.

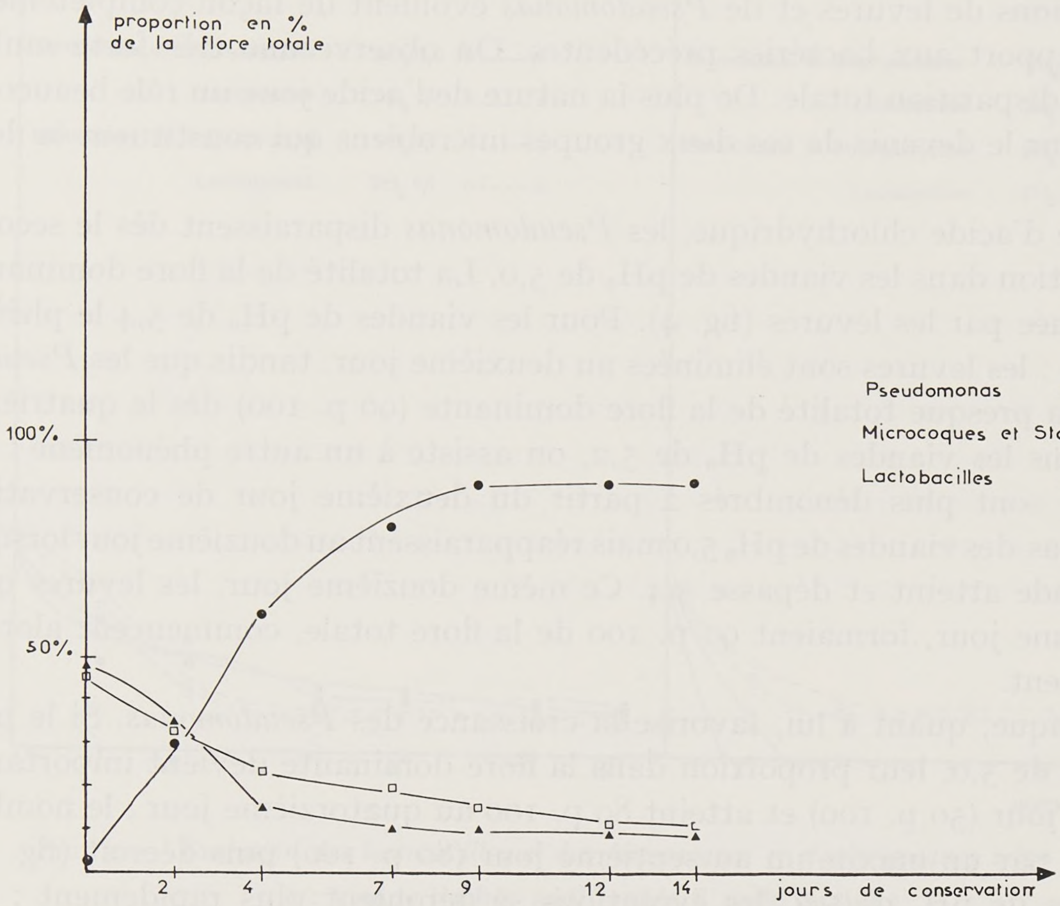



FIG. 5. — *Évolution comparée, au cours d'une conservation à +2, +4°C, des Pseudomonas, des lactobacilles, des microcoques et staphylocoques dans les viandes hachées de bœuf et de veau de pH initial 6,0*

## DISCUSSION ET CONCLUSION

Le pH semble avoir un rôle déterminant sur la microflore des viandes hachées de veau et de bœuf stockées à +2°, +4°C. Ce rôle n'est toutefois nettement mis en évidence qu'aux valeurs égales ou inférieures à 5,4. On remarque, en particulier, que les levures dénombrées en faible quantité dans la flore initiale très diversifiée deviennent rapidement le groupe le plus nombreux quand le pH de la viande varie entre 5,0 et 5,2. Cette dominance des levures aux pH les plus faibles, dans la gamme des $pH_0$ considérés dans cette étude, confirme les observations de GIBBONS et ROSE (1950) dont les travaux ont montré, notamment, un développement très abondant des levures aux pH voisins de 5,0.

Toutefois, si l'on constate une variabilité de la composition de la microflore dans les échantillons selon le pH initial, il est assez difficile de dire si les évolutions parallèles des microflores contaminantes sont directement influencées par le pH. On note, en effet, une élévation nette plus ou moins importante et plus ou moins précoce du pH des différents échantillons. L'accroissement de leur pH résulte notamment des désaminations (accumulation d'ammoniaque) et des décarboxylations (accumulation d'amines) consécutives à la multiplication des micro-organismes dans la viande. L'influence de ces produits de dégradation, indépendamment du pH lui-même, peut être aussi déterminante dans la disparition, la croissance ou l'apparition soudaine de genres microbiens dans la flore dominante. Le développement d'un genre

microbien au moins, *Pseudomonas*, paraît néanmoins directement lié à la valeur du pH. Nous avons observé, en effet, l'apparition systématique de cette bactérie dans la flore dominante des échantillons analysés dès que le pH atteignait la valeur 5,4-5,6. Cette apparition explicable dans les viandes hachées de pH initiaux supérieurs ou égaux à 5,4 apparaît moins évidente dans celles où les pH acides avaient auparavant sélectionné les seules levures comme micro-organismes contaminants.

On peut penser que ces bactéries sont restées viables dans les viandes de bas pH sans se multiplier. Ce phénomène est à rapprocher de celui observé par FOURNAUD et LAURET (1972) dans les saumures de viande où la teneur en chlorure de sodium ne permet ni leur croissance, ni leur destruction. Les pH relativement acides pour la viande auraient donc, comme le sel, un effet bactériostatique et non bactéricide.

L'envahissement du produit par les *Pseudomonas*, quand le pH se trouve favorable, peut s'expliquer par les différences existant entre les taux de multiplication des diverses populations microbiennes. En effet, selon CATSARAS et GREBOT (1969), les *Pseudomonas* se multiplient plus rapidement que les autres vers +2°, +4°C. Leur présence en grand nombre masque alors une éventuelle action du pH sur les autres groupes bactériens : lactobacilles, microcoques et staphylocoques, entérobactéries, streptocoques et *Arthrobacter*. Cependant ceci ne peut s'appliquer à *Microbacterium*, car ce micro-organisme se développe de façon comparable aux *Pseudomonas* à basse température et aux pH normaux de la viande (FOURNAUD *et al.*, 1973). Il semble que l'on serait là plutôt en présence d'une inhibition due aux lactobacilles ainsi que l'ont suggéré ROTH et CLARK (1972).

Un des buts de cette étude était de préciser l'influence de l'anion de la substance acide ajoutée à la viande et de comparer l'action de l'ion lactate par rapport à celle de l'ion chlore. Nos résultats ne permettent pas de confirmer à cet égard l'éventuelle action inhibitrice de l'ion lactate rapportée par JENSEN (1954). Cette éventuelle propriété spécifique n'apparaît pas. On remarque, au contraire, une action antimicrobienne plus accentuée de l'acide chlorhydrique dans tous les échantillons acidifiés (fig. 1). De plus, le pH reste stable plus longtemps dans les viandes hachées additionnées d'acide chlorhydrique que dans celles additionnées d'acide lactique (fig. 2). Cette stabilité est particulièrement nette dans les échantillons de bas $pH_0$ de 5,0 et 5,2. La persistance de la valeur initiale du pH entraîne la constance de composition de la flore dominante formée presque uniquement de levures.

L'augmentation du pH dans les échantillons acidifiés par l'acide lactique conduit à modifier la composition de la flore dominante, les *Pseudomonas* se multipliant et éliminant les levures. Cette élévation du pH tient vraisemblablement à l'utilisation par les micro-organismes de l'ion lactate comme source de carbone. L'ion lactate n'a donc pas, dans nos conditions expérimentales, d'action inhibitrice ; il neutralise, au contraire, les effets dûs au pH.

En conclusion, il apparaît que l'on peut ralentir l'évolution de la flore microbienne des viandes par acidification. L'addition d'acide semble avoir des effets bactériostatiques marqués qui peuvent intéresser divers secteurs de la technologie carnée, notamment lorsqu'il est recherché une stabilisation efficace et de courte durée. L'adjonction d'acide pose toutefois des problèmes sur le plan de la couleur et du pouvoir de rétention d'eau des viandes qu'il conviendrait d'apprécier, dans chaque application particulière, avant de décider de l'opportunité de sa mise en œuvre. Sur un autre plan, les résultats de cette étude suggèrent qu'il serait intéressant d'étudier le rôle de l'acidi-

fication sur l'évolution des microflores au sein des masses musculaires. En effet, de paucimicrobienne après ressuyage, la contamination bactérienne à cœur des muscles augmente régulièrement au cours de la conservation. On pourrait alors envisager une modification de l'acidification naturelle par un traitement approprié des animaux *antemortem*.

*Reçu pour publication en mai 1975.*

## SUMMARY

### RELATIONSHIPS BETWEEN THE PH AND THE MICROFLORA OF BEEF AND VEAL GROUND MEAT

The acidification of beef and veal ground meat induces a slow development of the microflora for a conservation of 14 days at 2°-4°C. This fact is specially observed in ground meat when pH is egal or lower than 5.2 for added lactic acid and than 5.4 for chlorhydric acid. The pH value rises up more or less rapidly and strongly during the storage according to the anion. The composition of the flora depends of starting pH and turns according to the pH which results of the action of this flora on the meat and the added acid in the case of lactic acid. The yeasts growth so much that the pH remains equal or lower than 5.4, while *Pseudomonas* multiply then when the pH arrives or is upper than 5.4. The meat color turns greyish in surface. Nevertheless, the meat appearance may not conduce to refuse acidification as bacteriostatic process.

## RESUMEN

### RELACIONES ENTRE EL pH Y LA MICROFLORA DE LAS CARNES PICADAS DE ANIMALES BOVINOS

La acidificación de las carnes picadas de animales bovinos (vaca y ternera) acarrea una discriminución del crecimiento de la microflora dominante durante el transcurso de 14 días de conservación a +2°C, +4°C. Este fenómeno se destaca particularmente en el caso de las carnes picadas de pH iniciales equivalentes o inferiores a 5,2 en el caso de adición de ácido láctico y a 5,4 en el caso de ácido clorhídrico. Los pH se elevan con mayor o menor rapidez y fuertemente durante el transcurso del almacenamiento según el anión presente. La composición de la flora dominante depende del pH inicial y y evoluciona en función del pH derivado de la acción de esta flora sobre la carne y el ácido añadido en el caso del ión lactato. Las levaduras dominan en tanto que el pH alcanza un valor 5,4 ó superior. El color de la carne torna en superficie hacia un tono grisáceo. No obstante, el aspecto de la carne no puede *a priori* hacer desechar la acidificación como procedimiento bacteriostático.

## RIASSUNTO

### RELAZIONI TRA IL pH E LA MICROFLORA DELLA CARNE TRITATA DI BOVINI

L'acidificazione della carne tritata di bovini (bue e vitello) causa un rallentamento nella crescita della microflora dominante durante i 14 giorni di conservazione a +2°C, +4°C. Questo fenomeno è particolarmente marcato per la carne tritata avente un pH iniziale uguale o inferiore

a 5,2 nel caso di aggiunta di acido lattico e a 5,4 nel caso di acido cloridrico. I pH si elevano più o meno rapidamente e più o meno fortemente durante lo stoccaggio secondo l'anione presente. La composizione della flora dominante dipende dal pH iniziale ed evolve in funzione del pH che risulta dell'azione di questa flora sulla carne e dell'acido aggiunto nel caso dell'ione lattato. I lieviti dominano fino a quando il pH resta inferiore o uguale a 5,4 mentre i Pseudomonas si moltiplicano quando il pH raggiunge o supera 5,4. La carne in superficie acquista un colore grigiastro. Tuttavia l'aspetto della carne non puo' *a priori* far escludere l'acidificazione come procedimento batteriostatico.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES


Catsaras M., Grebot D., 1969. Étude complémentaire sur les bactéries psychrotrophes des viandes. *Ann. Inst. Pasteur* Lille, **20**, 231-238.

Chapman G. H., 1945. The significance of sodium chloride in studies of staphylococci. *J. Bact.*, **50**, 201-203.

Erickson F. J., Fabian, 1942. Preserving and germicidal action of various sugars and organic acids on yeast and bacteria. *Food. Res.*, **7**, 68-79. Cité par Jensen (1954), *Microbiology of meats*. Third Edition, Champaign, Illinois. Garrard Press.

Fournaud J., Lauret R., 1972. Position taxonomique des bactéries mobiles à Gram négatif, aérobies strictes, isolées de saumures de viande. *Zbl. Bakt. Hyg., I, Abt. Orig. A*, **222**, 70-89.

Fournaud J., Salé P., Valin C., 1973. Conservation de la viande bovine sous emballage plastique, sous vide ou en atmosphère contrôlée. Aspects biochimique et microbiologique. *XIX Réun. Eur. Chercheurs en viande*, Paris.

Gibbons N. E., Rose D., 1950. Effect of *ante mortem* treatment of pigs on the quality of wiltshire bacon. *Can. J. Res.*, **F28**, 438-450.

Ingram M., 1948. Fatigue musculaire, pH et prolifération bactérienne dans la viande. *Ann. Inst. Pasteur*, **75**, 139-146.

Jensen L. B., 1954. *Microbiology of meats*. Third Edition, Champaign, Illinois. Garrard Press.

Naumann H. D., Balasundaram K. K., 1974. Extending the package life of fresh beef through sanitation and formulated gaseous atmospheres. *XX*[e] *Réun. Eur. Chercheurs en viande*, Dublin.

Raibaud P., Dickinson A. B., Sacquet E., Charlier H., Mocquot G., 1966. La microflore du tube digestif du Rat. I. Techniques d'étude et milieux de culture proposés. *Ann. Inst. Pasteur*, **110**, 568-590.

Reynolds A. E., Carpenter J. A., 1974. Bactericidal properties of acetic and propionic acids on pork carcasses. *J. anim. Sci.*, **38**, 515-519.

Rhoades E. R., Short S. G., 1970. Susceptibility of *Serratia*, *Pseudomonas* and *Enterobacter* to acetic acid. *Antimicrob. Ag. Chemother*, 498-502.

Roth L. A., Clark D. S., 1972. Growth of *Microbacterium thermosphactum* on fresh beef. *18th Meet. Meat Res. Workers*, Guelph.

*Ann. Technol. agric.*, 1975, **24** (2), 205-215.

# MÉTABOLISME ANAÉROBIE DE LA BAIE DE RAISIN EN MILIEU LIQUIDE

## I. — Aspects méthodologiques

M. BURET, Y. CHAMBROY et C. FLANZY

*Station de Technologie des Produits végétaux,*
*Centre de Recherches d'Avignon, I. N. R. A.,*
*84140 Montfavet*

### RÉSUMÉ

Des baies de raisin intactes plongées dans le moût du fond d'une cuve de vinification en macération carbonique subissent le métabolisme anaérobie en milieu liquide. Certains aspects méthodologiques de l'étude de ce métabolisme sont décrits : méthode expérimentale ; critères de mesure de l'intensité du métabolisme anaérobie ; calcul des différents types d'inhibitions créés dans ce milieu par rapport au métabolisme anaérobie en milieux gazeux ; mesure des processus de diffusion qui accompagnent le métabolisme anaérobie ; méthode de mise en évidence d'un compartimentage de substrats dans la baie de raisin et d'évaluation de la dimension des compartiments.

Mots clés : *métabolisme anaérobie, raisin, macération carbonique, diffusion, compartiments.*

## I. — INTRODUCTION

Pendant la première étape fermentaire de la vinification par macération carbonique (MC) (1), une quantité variable de baies entières de raisin baignent dans le moût issu des baies qui ont éclaté lors de l'encuvage et au cours du tassement de la vendange (fig. 1) (Andre *et al.*, 1967). Les transformations subies par des baies plongées dans une phase anaérobie liquide sont vraisemblablement différentes de celles observées lors d'une anaérobiose en phase gazeuse. Selon la proportion des baies entières soumises à une anaérobiose en phase liquide, les caractéristiques et la qualité des vins obtenus peuvent être modifiées (Benard *et al.*, 1971, *a, b*). Parallè-

(1) MC : macération carbonique.

lement à des essais de vinification correspondant à ce thème, nous avons développé une expérimentation sur le métabolisme anaérobie (MA) [1] des baies de raisin plongées dans un milieu liquide.

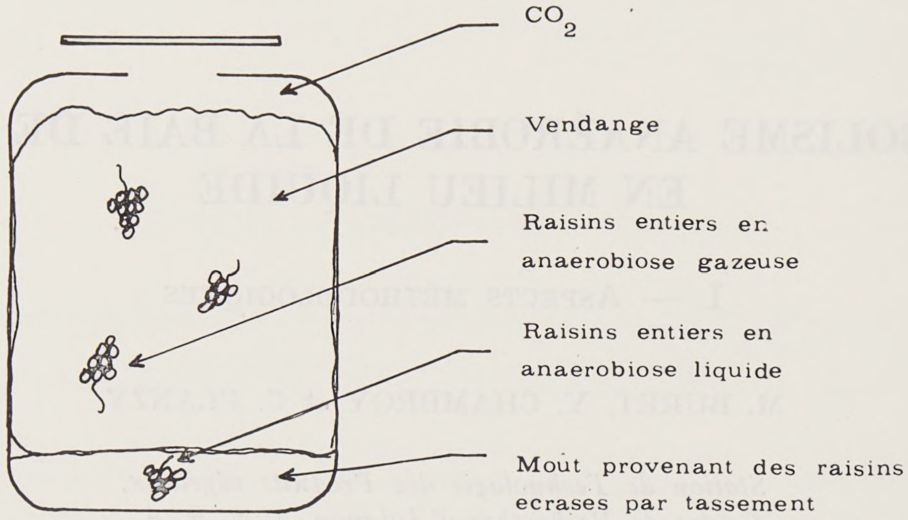



FIG. 1. — *Cuve de vinification par macération carbonique*
Première étape fermentaire

Le travail actuel se justifie principalement sur trois plans :

— d'une part il contribue à orienter la pratique de la MC par une meilleure maîtrise d'un facteur important de la vinification ;
— d'autre part, l'utilisation d'un agent d'anaérobiose (liquide) différent de ceux couramment employés (gaz) permet d'améliorer la connaissance du MA des baies de raisin ;
— enfin, il exige la mise au point de méthodes utilisables dans l'étude des échanges de substances entre deux phases, l'une solide, l'autre liquide.

## 2. — MÉTHODE EXPÉRIMENTALE

### 2. 1. — *Préliminaires*

Les résultats relatifs au MA en anaérobiose gazeuse ont montré que ce métabolisme pouvait être caractérisé chez le Raisin par la production d'une petite quantité d'éthanol (ANDRÉ et FLANZY, 1967) et par la dégradation partielle du malate (BURET et FLANZY, 1970). Ce sont essentiellement les variations de ces deux métabolites que nous avons choisies pour mettre en évidence et mesurer l'intensité du MA dans un milieu liquide. Par ailleurs, l'étude de l'extraction des substances polyphénoliques complète les résultats obtenus à l'aide des deux critères précédents.

L'ensemble des facteurs mis en jeu lorsque des baies de raisin entières sont plongées dans un moût en cours de fermentation est trop grand pour aborder l'étude du MA en phase liquide dans un milieu aussi complexe. Nous avons donc choisi d'étudier ces phénomènes dans des solutions simples qui peuvent être progressivement complétées en fonction des résultats acquis, afin de se rapprocher peu à peu de la composition du moût en cours de fermentation.

Une prolifération de levures intervient invariablement dans de l'eau, préalablement stérilisée, après un temps de contact relativement long (6 à 10 jours à 35°C) avec des baies de raisin lavées. L'eau stérilisée ne peut donc convenir comme solution simple initiale. Après une série d'essais en présence de différents antiseptiques, nous avons été conduits à adopter des solutions de métabisulfite de potassium à 300 ou 400 mg/l.

(1) MA : métabolisme anaérobie.

2. 2. — *Réalisation*

Des lots homogènes de raisin préparés selon la méthode décrite antérieurement (FLANZY *et al.*, 1969) permettent la réalisation de deux types de manipulation.

*Premier type d'expérience* (fig. 2).

Deux cas sont possibles :

1) Plusieurs échantillons comparables sont placés dans des fioles de Fourneau, dans le même volume d'une solution identique. Des prélèvements de solution et de lots de baies sont effectués en fonction du temps.

2) Des lots homologues sont plongés dans des solutions de volume ou de composition différents tandis que les prélèvements sont réalisés simultanément au bout d'un temps suffisamment long pour que le MA ait eu lieu.

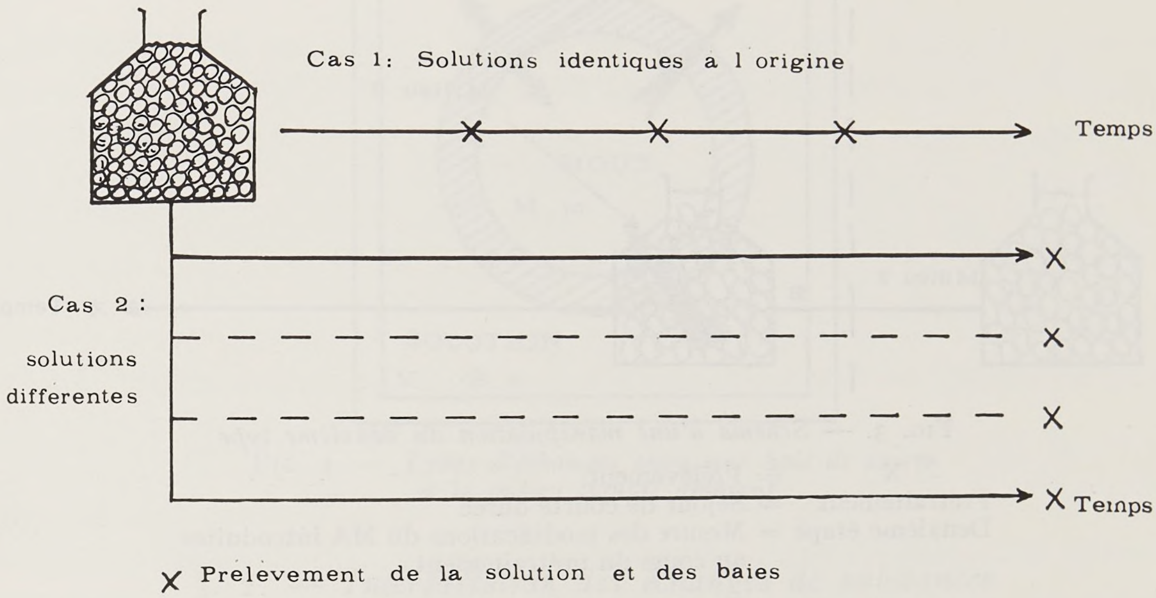



FIG. 2. — *Schéma d'une manipulation du premier type*

*Intérêt et limite de ce schéma.*

Des manipulations de ce type nous ont permis d'établir des cinétiques d'évolution de substrats caractéristiques du MA du raisin. De tels résultats confirment l'existence, atténuée certes, de ce métabolisme dans un milieu liquide et montrent l'importance des processus de diffusion de substances qui s'y rattachent. L'influence de la composition et du volume de la solution, pour un même poids de raisin, a été abordée. Ces essais nous permettent de rapprocher la composition du milieu étudié de celui qui existe au fond d'une cuve de fermentation ; ils nous conduisent également à des hypothèses relatives à l'existence de compartiments de métabolites à l'intérieur de la baie.

Il faut cependant noter que, pour être significatives, les différences entre les échantillons doivent être suffisamment importantes. La mise en contact des baies et de la solution doit donc être assez longue. Ce facteur limite l'emploi et la portée des résultats que l'on peut espérer en utilisant ce schéma de travail dans tous les cas où les conditions de manipulations amènent des perturbations (développement de levures, éclatement des baies) qui masquent le facteur que l'on veut étudier.

*Deuxième type d'expérience* (fig. 3).

La manipulation est divisée en deux étapes. Lors de la première étape (prétraitement), de courte durée, des échantillons comparables sont placés dans des milieux différents ; ces milieux sont supposés être responsables de modifications du MA ou des caractéristiques des baies qui passent plus ou moins inaperçues à ce stade. Lors d'une deuxième étape, tous les échantillons sont placés dans le même milieu. Ces nouvelles conditions sont telles qu'elles ne perturbent pas sensiblement le MA ou la structure des baies. Ce deuxième stade permet en les amplifiant de mettre en évidence les modifications créées lors de la première étape.

L'intérêt d'un tel type de manipulation est de pouvoir soumettre les baies à des conditions qu'elles ne pourraient subir pendant une longue durée sans que d'autres facteurs ne viennent interférer avec celui ou ceux que l'on veut étudier. Nous sélectionnons ainsi plus facilement que dans le schéma précédent l'étude d'un seul facteur. La méthode de travail devient ici plus sensible mais s'écarte beaucoup du modèle de la cuve de vinification qui a conduit nos premiers essais.

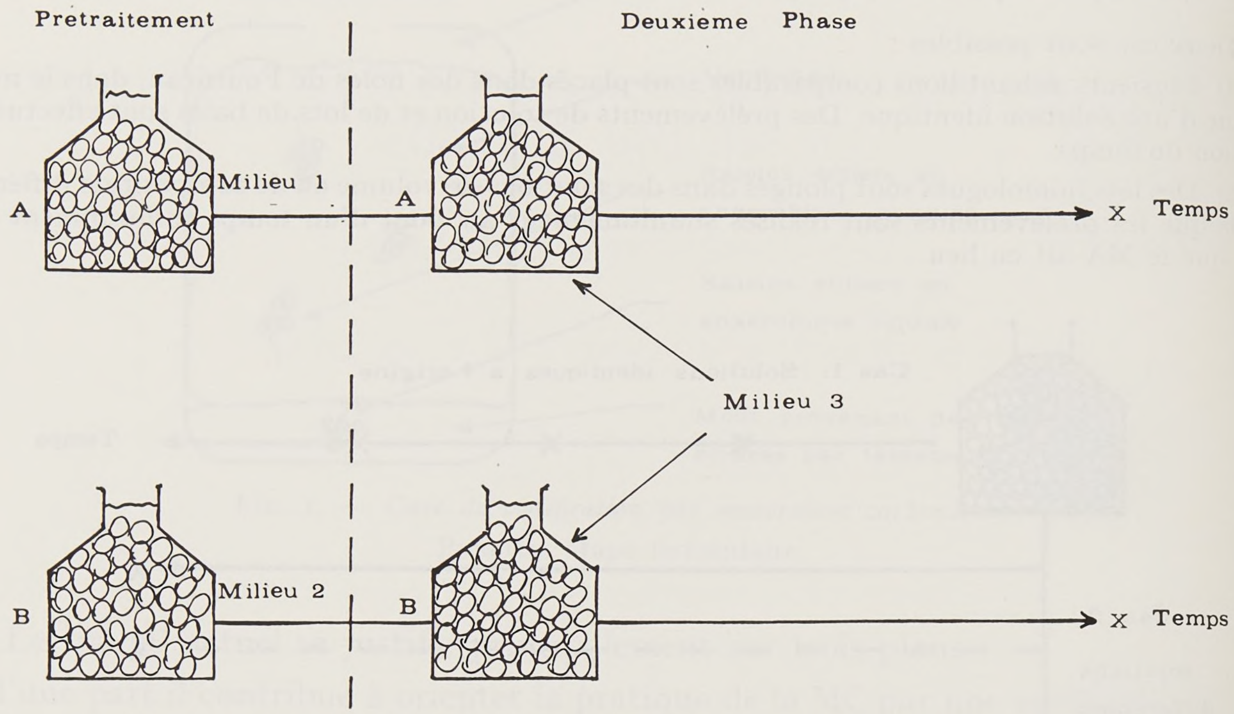



FIG. 3. — *Schéma d'une manipulation du deuxième type*

X = Prélèvement
Prétraitement = Séjour de courte durée
Deuxième étape = Mesure des modifications du MA introduites au cours du prétraitement

## 3. — INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Les premiers résultats obtenus (FLANZY et BURET, 1970 ; BURET, 1971) ont montré que les différences qui peuvent exister entre le MA en phase gazeuse et le MA en phase liquide se situent soit au niveau de processus d'échanges de substances entre les baies et la solution, soit au niveau de processus qui modifient l'intensité de ce métabolisme.

### 3. I. — *Définitions* (fig. 4)

Le moût est le jus obtenu après pressurage des baies (sous une pression constante = 3 kg/cm²). La solution constitue le milieu ambiant dans lequel sont plongées les baies.

Concentrations et quantités sont exprimées en milligrammes (éthanol, acide gallique), grammes (sucres réducteurs), milliéquivalents (acide malique), respectivement par litre et pour 1 000 g de raisin.

Nous appelons *m* la concentration d'une substance mesurée par litre de moût et M la quantité de cette substance contenue dans 1 000 g de raisin. Nous avons

entre $m$ et M la relation $M = \frac{m}{1,2}$ car nous considérons que 120 kg de raisin donnent 100 l de moût (cas du *Carignan* essentiellement).

Nous appelons $e$ la concentration de la même substance par litre de solution correspondant à l'échantillon et S la quantité de cette substance qui se trouverait en fin de manipulation dans la solution utilisée pour 1 000 g de raisin. Nous avons entre $e$ et S la relation $S = e \cdot \frac{V}{P}$ où V est le volume de la solution mise en œuvre pour un poids P de raisin.

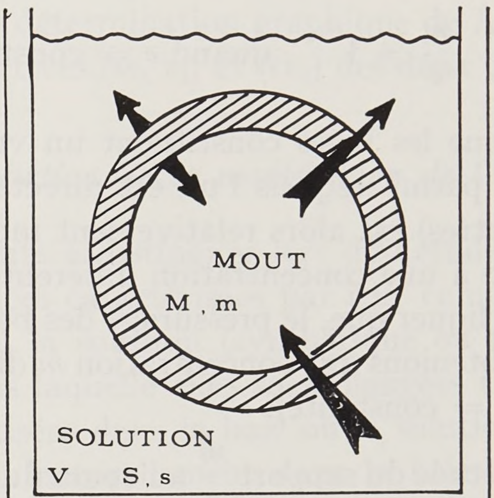



FIG. 4. — *Types d'échanges entre une baie de raisin et le milieu liquide ambiant*

### 3. 2. — *Interprétation des échanges de substances entre les baies et la solution*

3. 21. *Pourcentage de diffusion.*

La quantité d'une substance qui diffuse peut être mesurée par la valeur de S pour des échantillons identiques au départ. Cependant, lors de la comparaison d'échantillons initialement différents (variété, maturité), il faut pouvoir tenir compte de la quantité totale de substance mise en jeu. C'est pourquoi nous avons mesuré quantitativement les processus de diffusion par le *pourcentage de diffusion*. Ce dernier est défini par le rapport qui existe entre la quantité d'une substance ayant diffusé et la quantité totale de la substance susceptible de migrer. Soit, si l'on respecte les définitions précédentes, pour une substance de la baie qui passe dans la solution, le pourcentage de diffusion D s'écrit : $D = \frac{S}{S + M} \times 100$.

Du point de vue œnologique, D renseigne sur la quantité de substance qui est soustraite au MA de la baie par diffusion et qui se retrouve dans le jus de goutte (cas de l'acide malique). Ce peut être également un indice de résistance des baies lorsque l'on veut comparer des états de maturité ou des variétés différents.

3. 22. *Équilibre de diffusion.*

Nous admettons que pour qu'il y ait équilibre entre le moût et la solution, il faut que la concentration de la substance considérée reste constante, après la mise à l'équilibre, dans la solution : soit $e$ = constante.

Dans ces conditions, la comparaison des concentrations dans les baies et dans la solution correspondante nous conduit à supposer l'existence de compartiments plus ou moins indépendants, pour une même substance, à l'intérieur de la baie.

En effet :

$$\text{si} \quad \frac{m}{e} = 1 \quad \text{quand } e = \text{constante}$$

nous pouvons considérer que l'ensemble des baies se comporte comme un volume homogène vis-à-vis de la solution. La substance considérée se répartit d'une façon uniforme dans la baie qui ne contient qu'un compartiment vis-à-vis de celle-ci.

$$\text{Si} \quad \frac{m}{e} \neq 1 \quad \text{quand } e = \text{constante}$$

nous pouvons considérer que les baies constituent un volume hétérogène de deux compartiments, au moins, parmi lesquels l'un est directement en équilibre avec la solution ; l'autre (ou les autres) est alors relativement indépendant du précédent et de la solution ; il se trouve à une concentration différente de celle mesurée dans la solution. Ceci permet d'expliquer que, le pressurage des baies provoquant le mélange des compartiments, nous obtenions une concentration $m$ du moût total différente de $e$ malgré l'état d'équilibre ($e$ = constante).

Dans ces conditions, l'étude du rapport $\frac{m}{e}$ au cours du MA en milieu liquide peut contribuer au développement d'hypothèses relatives à l'évolution de la structure de la cellule et des tissus de la baie de raisin.

*Discussion de l'hypothèse du compartimentage de la baie de raisin.*

L'existence de compartiments à l'intérieur de la baie doit se traduire par les propriétés suivantes de $e$ et D quand le volume de la solution V tend vers l'infini.

La quantité de substance susceptible de migrer dans la solution est finie, donc sa concentration $e \to 0$.

La quantité de substance qui reste dans la baie M correspond alors à celle qui appartient au(x) compartiment(s) relativement indépendant(s) de la solution. Ainsi $M \to$ limite finie $\neq 0$ s'il existe au moins 2 compartiments.

En conséquence $D = \frac{S}{M + S} \times 100$, limite inférieure à 100.

Nous pouvons vérifier expérimentalement ces propriétés.

D'autre part, l'étude de D en fonction du volume de la solution peut permettre une évaluation de la taille des compartiments (en se limitant à l'existence de deux compartiments).

Soit Q la quantité totale de substance mise en jeu à l'équilibre,
$m_1$ la concentration de cette substance dans le compartiment 1 de volume $v_1$,
$m_2 = e$ la concentration de la même substance dans le compartiment 2 de volume $v_2$.

Nous avons $Q = M + S = m_1 v_1 + e v_2 + eV$

$$e = \frac{Q - m_1 v_1}{v_2 + V} \quad \text{et} \quad S = eV = \frac{Q - m_1 v_1}{v_2 + V} V$$

d'où
$$D = \frac{S}{M + S} = \frac{\frac{Q - m_1 v_1}{v_2 + V} V}{Q} = \frac{\frac{Q - m_1 v_1}{Q} V}{v_2 + V}$$

$$D = \frac{AV}{v_2 + V}$$

L'expression de D en fonction du volume de la solution V est une équation dont la représentation graphique est une hyperbole, si Q est indépendant de V solution. Nous obtenons une relation linéaire en coordonnées inverses $\frac{1}{D}$ et $\frac{1}{V}$, $\frac{1}{D} = \frac{1}{A} + \frac{(v_2)}{A} \frac{1}{V}$. Cette équation permet une détermination graphique de A et $v_2$. Il est alors possible de calculer les tailles respectives ($m_1 v_1$) et ($ev_2$) des deux compartiments.

### 3. 3. — *Interprétation de la modification de l'intensité du* MA

Nous avons été conduits à distinguer lors de l'étude du MA en milieu liquide quatre groupes de substances caractérisées par leur comportement dans l'ensemble constitué par les baies et la solution (synthétique ou moût provenant des baies écrasées dans la cuve) dans laquelle elles sont plongées (fig. 4).

1. Substances synthétisées dans la baie ou la solution (cas de l'éthanol).
2. Substances existant naturellement dans la baie ou la solution et qui sont partiellement transformées au cours du MA (cas du malate).
3. Substances existant dans la baie ou la solution et qui ne sont apparemment pas métabolisées pendant le MA. C'est le cas des polyphénols totaux où nous étudions essentiellement les phénomènes de dissolution et d'extraction à partir des pellicules.
4. Substances artificiellement ajoutées au moût et qui n'existent pas naturellement dans la baie (cas du $SO_2$).

Les substances appartenant aux trois premiers groupes peuvent subir des échanges dans le sens baies-solution et inversement. Par contre, les échanges relatifs aux substances du groupe 4 ne s'effectuent que dans le sens solution-baies.

La mesure de l'intensité du MA s'effectue à l'aide de substances de la baie qui appartiennent aux groupes 1 et 2, alors que toute substance peut être un agent responsable de la modification de l'intensité du MA mesurée.

Dans tous les cas, nous exprimons la modification du MA en milieu liquide en comparaison avec le MA en milieu gazeux par le rapport I suivant :

$$\frac{\text{Différence dans l'évolution de la substance entre le milieu gazeux et le milieu liquide}}{\text{Évolution de cette substance en milieu gazeux}} \cdot 100$$

Soit $I = \frac{X - Y}{X} \cdot 100$,

où X = Quantité de substance métabolisée par le MA en milieu gazeux,
Y = Quantité de substance métabolisée par le MA en milieu liquide.

*Remarque* : le signe positif ou négatif de I indique si l'effet observé est une activation (I négatif) ou une inhibition (I positif).

3\. 31. *Mesures relatives aux substances du groupe 1* (éthanol).

Lors du MA en milieu anaérobie gazeux il y a synthèse d'une quantité X

X

|————————————|

Lors du MA en milieu liquide, il y a synthèse d'une quantité Y qui se répartit entre le moût M et la solution S

M S

|——————|——————|

Y

La modification de l'évolution de cette substance s'écrit donc :

$$I = \frac{X - Y}{X} \cdot 100 = \frac{X - (M + S)}{X} \cdot 100$$

3\. 32. *Mesures relatives aux substances du groupe 2* (malate).

Soit un témoin contenant la quantité T de substance au temps 0

T

|————————————|

Après un temps donné

— en milieu gazeux, une quantité X est catabolisée et il reste C

X C

|————————|————|

— en milieu liquide, une quantité Y est catabolisée et il reste E = M + S

E

Y M S

|————————|————|————|

Nous appelons $I_1 = \frac{X - Y}{X} \cdot 100 = \frac{E - C}{T - C} \cdot 100$ l'inhibition globale du catabolisme de cette substance.

Formulons deux hypothèses.

1\) Nous pouvons considérer que la quantité S qui a diffusé est soustraite à l'action du MA. C'est donc un échantillon renfermant la quantité T — S au temps 0 qui a catabolisé une quantité Y.

2\) La quantité métabolisée est proportionnelle à la quantité initiale. Si tout T avait été soumis au MA nous aurions eu une quantité catabolisée $Y_1 = \frac{TY}{T - S}$.

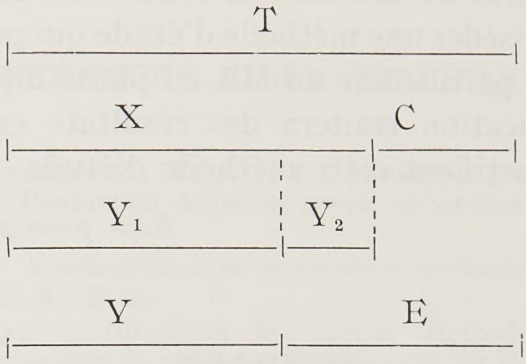
D'où l'expression :

$$I_2 = \frac{X - Y_1}{X} \cdot 100 = \left[1 - \frac{T\,(T - E)}{(T - C)\,(T - S)}\right] \cdot 100.$$

Dans cette expression, l'influence de la diffusion d'une partie de la substance de la baie vers la solution a été éliminée. L'inhibition $I_2$ peut ainsi être attribuée à l'action du milieu sur l'activité métabolique des baies.

L'hypothèse que nous venons de faire (S soustrait au MA) nous conduit à considérer que la diffusion elle-même joue un rôle sur la modification de l'intensité du MA en milieu liquide.

Reprenons le schéma de la dégradation




La quantité $Y_2 = X - Y_1$ est la quantité de substance qui n'a pas été dégradée à cause de l'inhibition $I_2$. Donc $X - (Y + Y_2)$ est la part de la quantité de S qui aurait été dégradée avec une inhibition $I_2$ s'il n'y avait pas de diffusion.

$I_3 = \frac{X - (Y + Y_2)}{X} \cdot 100 = \frac{S\,(T - E)}{(T - C)\,(T - S)} \cdot 100$ correspond donc à l'influence de la diffusion dans l'inhibition globale du MA d'un échantillon.

Ainsi, les deux hypothèses que nous avons faites (S soustraite au MA ; la quantité métabolisée proportionnelle à la quantité initiale) permettent de considérer l'inhibition globale $I_1$ comme la somme de deux inhibitions $I_2$ et $I_3$ qui se rapportent respectivement à l'activité métabolique de la baie et aux processus de diffusion pendant une anaérobiose en milieu liquide.

*Remarque :* par analogie, nous pouvons considérer que l'inhibition mesurée dans le cas des substances du groupe 1 est le résultat de deux inhibitions $I_2$ et $I_3$. Dans ce cas, la disparition de la baie de la substance synthétisée, par les phénomènes de diffusion, pourrait avoir un effet activateur ($I_3 < 0$). Mais dans ce cas le calcul ne permet pas de dissocier ces facteurs.

## 4. — CONCLUSIONS

L'étude de certains aspects théoriques d'une expérimentation sur le MA en milieu liquide nous a conduits à développer une méthode expérimentale qui, parallèlement à une description de ce métabolisme, permet des mesures quantitatives de l'action du milieu liquide. L'influence de la phase liquide s'exerce à deux niveaux : les processus de diffusion et les modifications de l'intensité du MA en milieu liquide comparée à celle du MA en milieu gazeux.

Les processus de diffusion sont mesurés par le pourcentage et l'étude de l'équilibre de diffusion. Ces deux notions nous ont conduits à l'hypothèse de l'existence de compartiments de substrats dans la baie de raisin. Nous pouvons ainsi espérer obtenir des résultats relatifs à la structure des baies et à son évolution au cours, soit de la vie du fruit, soit de divers traitements que nous pouvons lui faire subir.

Les modifications de l'intensité du MA créées par le milieu liquide peuvent être, au moins en ce qui concerne les substances catabolisées par la baie, le résultat de

deux actions. L'une correspond à la diffusion de la substance de la baie vers la solution et l'autre à une action directe sur l'activité métabolique de la baie, qui peut, elle aussi, être sous la dépendance de modifications structurales au cours du MA.

Ainsi, par l'utilisation combinée des principes expérimentaux que nous avons décrits, associée aux critères de mesures de l'intensité du MA et des processus de diffusion, nous pensons posséder une méthode d'étude qui permet de recouvrir l'essentiel des différents aspects particuliers au MA en phase liquide.

Une prochaine publication traitera des résultats expérimentaux obtenus et précisera les points qui justifient cette méthode d'étude.

*Reçu pour publication en juin 1975.*

## SUMMARY

ANAEROBIC METABOLISM OF THE GRAPE BERRY IN LIQUID MEDIUM.
I. — METHODOLOGIC ASPECTS

Whole grape berries, immersed in the must at the bottom of a carbonic maceration vinification vat, undergo anaerobic metabolism in liquid medium. Some methodologic aspects of the study of this metabolism are described : experimental prodecure ; criteria of measuring the intensity of anaerobic metabolism ; calculation of the different types of inhibitions created in this medium compared with anaerobic metabolism in gaseous medium ; measurement of the diffusion processes that accompany anaerobic metabolism ; procedure for showing a compartmentation of substrates in the grape berry and estimating the size of the compartments.

## RESUMEN

METABOLISMO ANAEROBIO DE LA BAYA DE LA UVA EN MEDIO LIQUIDO.
I. — ASPECTO METODOLOGICO

Las bayas de la uva intactas, sumergidas en el mosto del fondo de una cuba de vinificación en maceración carbónica quedan sometidas a un metabolismo anaerobio en medio líquido. Figuran descritos ciertos aspectos metodológicos del estudio de dicho metabolismo : método experimental ; criterios de medición de la intensidad del metabolismo anaerobio ; cálculo de los distintos tipos de inhibiciones creadas en dicho medio en relación con el metabolismo anaerobio en medio gaseoso ; medición de los procesos de difusión que acompañan al metabolismo anaerobio : método de evidenciación de una compartimentación de substratos en la baya de la uva y evaluación de la dimensión de los compartimientos.

## RIASSUNTO

METABOLISMO ANAEROBICO DELLA BACCA
DELL'UVA IN MEZZO LIQUIDO.
I. — ASPETTO METODOLOGICO

Le bacche d'uva intatte immerse nel mosto del fondo di una vasca di vinificazione in macerazione carbonica, subiscono il metabolismo anaerobico in mezzo liquido. Vengono descritti alcuni aspetti metodologici dello studio di questo metabolismo : metodo sperimentale, criteri di misura

dell'intensità del metabolismo anaerobico ; calcolo dei diversi tipi d'inibizioni creatisi in questo mezzo rispetto al metabolismo anaerobico in mezzo gassoso ; misura dei procedimenti di diffusione che accompagnano il metabolismo anaerobico : metodo di messa in evidenza di una compartizione dei sostrati nella bacca d'uva e metodo di valutazione della dimensione dei compartimenti.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

André P., Benard P., Chambroy Y., Flanzy C., Jouret C., 1967. Méthode de vinification par macération carbonique. I. Production de jus de goutte en vinification par macération carbonique. *Ann. Technol. agric.*, **16**, 109-116.

André P., Flanzy C., 1967. Vinification avec macération carbonique. *2e Symposium international d'Œnologie*, **2**, 531-548, I. N. R. A., Paris.

Bénard P., Buret M., Flanzy C., Bourzeix M., 1971 *a*. Méthode de vinification par macération carbonique. V. Influence de la hauteur de vendange dans la cuve sur la qualité des vins. *Ann. Technol. agric.*, **20**, 35-47.

Bénard P., Bourzeix M., Buret M., Flanzy C., Mourgues J., 1971 *b*. Méthode de vinification par macération carbonique. VI. Élaboration des vins blancs secs. *Ann. Technol. agric.*, **20**, 199-215.

Buret M., 1971. Fermentation intracellulaire de baies de raisin plongées dans un milieu liquide. *C. R. Journées Macération Carbonique*, 10-11 février 1971, 84-99.

Buret M., Flanzy C., 1970. Évolution de l'acide malique au cours de la fermentation intracellulaire de baies de raisin placées en anaérobiose, à l'obscurité : influence du cépage et de la température. *C. R. Acad. agric.*, **56**, 418-422.

Flanzy C., Flanzy M., André P., Chambroy Y., 1969. Fixation à l'obscurité de $^{14}CO_2$ gazeux par des baies de raisin en anaérobiose. II. Devenir du $^{14}C$ au cours de la fermentation intracellulaire. *Ann. Technol. agric.*, **18**, 307-325.

Flanzy C., Buret M., 1970. Fermentation intracellulaire et phénomènes de diffusion en anaérobiose liquide. *C. R. Acad. agric.*, **56**, 422-428.

*Ann. Technol. agric.*, 1975, **24** (2), 217-236.

MISE AU POINT

# COMPOSITION BIOCHIMIQUE ET QUALITÉ DES PÊCHES

M. SOUTY et P. ANDRÉ

*Station de Technologie des Produits végétaux,*
*Centre de Recherches d'Avignon, I. N. R. A.,*
*84140 Montfavet*

## RÉSUMÉ

Les principaux constituants biochimiques des pêches sont passés en revue. Quelques exemples sur leur répartition variétale, notamment en ce qui concerne les sucres, les acides organiques et les substances pectiques, sont donnés, et leur rôle sur la qualité est discuté.

## INTRODUCTION

La Pêche est une drupe, fruit charnu dont le péricarpe comprend :

— l'endocarpe, partie indurée (noyau)
— le mésocarpe, partie comestible (chair)
— l'épicarpe, généralement non consommé (peau).

Pour la plupart des consommateurs, la Pêche est un « fruit d'été », « de vacances ». C'est un fruit riche en éléments nutritionnels et gustatifs s'il est de bonne qualité. Malheureusement il arrive que celle-ci laisse à désirer et ne satisfait plus le consommateur. Il faut en connaître les raisons pour y remédier.

Quels sont les principaux constituants biochimiques présents dans ce péricarpe charnu et comestible, quel rôle jouent-ils vis-à-vis des caractères organoleptiques, quelle est leur répartition selon les variétés ? C'est à ces questions que nous allons essayer de répondre.

Deux groupes de constituants bien différents entrent dans la composition de la chair de la Pêche :

A. L'eau et les sels minéraux.
B. Des substances organiques variées et nombreuses.

Ces constituants possèdent tous une valeur organoleptique propre. Nous nous limiterons à l'examen de quelques-uns des principaux d'entre eux.

Les premiers travaux sur la composition chimique de diverses variétés de pêches ont été réalisés en France par PEYNAUD et GENEVOIS de 1946 à 1949 sur des fruits prélevés dans les vergers de collection de la Station de Recherches d'Arboriculture Fruitière de la Grande Ferrade, près de Bordeaux.

Depuis 1966, de nombreux travaux ont été entrepris par SOUTY *et al.* (1970) sur les collections plus récentes implantées par la Station précitée sur son domaine expérimental de Manduel, près de Nîmes (Gard).

Dans les deux cas, les études réalisées ont intéressé une gamme variétale non seulement étendue, mais aussi soumise à des conditions identiques de milieu (climat et sol) et de technique culturale. De telles conditions ont permis une connaissance précise et comparative de la composition biochimique des fruits, toute différence mise en évidence pouvant alors être imputée avec certitude à la constitution génétique propre à chacun des types variétaux examinés. De telles comparaisons sont peu nombreuses dans la littérature étrangère.

## A. — L'EAU ET LES SELS MINÉRAUX

L'eau représente la plus grande partie du fruit et son rôle est primordial, car la plupart de tous les constituants y sont dissous. Cette richesse en eau est, dans le cas des pêches mûres, comprise entre 80 et 90 p. 100 du poids total du fruit. Elle se mesure le plus souvent par pesée du résidu sec obtenu dans des conditions bien définies à l'étuve à vide : l'extrait sec total.

TABLEAU I

*Teneur en eau de quelques cultivars de pêches*

| Variétés | Date de récolte (1966) | Extrait sec total (%) | Teneur en eau (%) |
|---|---|---|---|
| *Charles Ingouf* | 08-07 | 11,2 | 88,8 |
| *Dixired* | 08-07 | 10,9 | 89,1 |
| *Redhaven* | 19-07 | 13,2 | 86,8 |
| *P. San Lorenzo* | 23-07 | 13,1 | 86,9 |
| *P. Vesuvio* | 28-07 | 13,1 | 86,9 |
| *P. Escarolita* | 28-07 | 13,5 | 86,5 |
| *P. Stanford* | 04-09 | 13,8 | 86,2 |
| *P. Corona* | 16-09 | 14,3 | 85,7 |
| *Rubidoux* | 16-09 | 13,8 | 86,2 |
| *P. Golden Queen* | 21-09 | 17,4 | 82,6 |

Le tableau 1 indique quelques valeurs relevées au cours d'une campagne.

La mise en évidence, puis le dosage des sels minéraux, s'effectuent sur le résidu de calcination de l'extrait sec : les cendres. Ces sels minéraux interviennent dans le pouvoir tampon des jus du fruit, et par suite également sur leur pouvoir désaltérant.

TABLEAU 2

*Teneurs en éléments minéraux des pêches*
(d'après différents auteurs)
Résultats en mg p. 100 g de chair comestible

| | Na | K | Ca | Mg | Fe | Cu | P | S | Cl | Zn | Mn | I |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Pêche (1) | 3 | 230 | 8 | 10 | 0,4 | 0,05 | 22 | 7 | 3 | 0,02 | 0,66 | 0,002 |
| Pêche (2) | | 173 | 25,6 | 12 | | | 23,2 | | | | | |
| Pêche (3) | | 256 | 9 | 11 | | | 18 | | | | | |
| Pêche (4) | 2,7 | 259 | 4,8 | 7,9 | 0,38 | 0,05 | 18,5 | 5,7 | 1,0 | | | |
| Brugnon (1) | 9 | 268 | 4 | 12,6 | | | 24 | | 5 | 0,06 | | |
| Nectarine (4) | 9,1 | 268 | 3,9 | 12,6 | 0,46 | 0,06 | 23,9 | 10 | 4,7 | | | |

(1) CAUSERET, 1960 }
(2) KULISH, 1894 } in CHATT, 1966.
(3) SHERMAN, 1961 }
(4) Food Indust. Man., 1958.

Le tableau 2 rapporte la composition en éléments minéraux de la Pêche, selon quelques auteurs.

## B. — LES CONSTITUANTS ORGANIQUES

Parmi les constituants organiques dont dépendent les caractères organoleptiques, nous rencontrons :

— les sucres,
— les substances pectiques,
— les acides organiques,
— les constituants de l'arôme,
— la vitamine C,
— les substances colorées et les polyphénols.

### I. — *Les sucres*

Ce sont les constituants qui, après l'eau, sont pondéralement les plus importants. Dans la Pêche, trois sucres principaux sont présents dans des proportions variables : le glucose et le fructose constituant les sucres réducteurs, et le saccharose.

Dans le tableau 3, nous indiquons la répartition de ces sucres dans quelques cultivars récoltés à Manduel (Gard).

Dans le tableau 4, nous pouvons remarquer les proportions respectives des deux sucres réducteurs, glucose et fructose, d'après les travaux de SWEENEY *et al.* (1970). Nous voyons que glucose et fructose, en quantités sensiblement égales, représentent ensemble de 15 à 35 p. 100 des sucres totaux, le saccharose, à lui seul, intervenant pour 65 à 85 p. 100.

La richesse en sucres apparaît liée aux caractères organoleptiques ; elle est intéressante à

connaître et permet de préciser le rapport sucres/acidité : c'est l'un des premiers critères de maturité, et le plus utilisé. En réalité, ce rapport n'est pas toujours suffisant et on utilise aussi souvent la somme sucres + acidité (THIAULT, 1970).

TABLEAU 3

*Teneurs en sucres de quelques cultivars de pêches*
(g p. 100 g)

| Variétés | Sucres totaux | Saccharose | Sucres réduct. | Sa/ST |
|---|---|---|---|---|
| *Springtime* | 8,1 | 4,2 | 3,9 | 0,52 |
| *Robin* | 9,8 | 7,5 | 2,3 | 0,77 |
| *Charles Ingouf* | 8,0 | 6,0 | 2,0 | 0,75 |
| *Dixired* | 7,0 | 5,7 | 1,3 | 0,81 |
| *Redhaven* | 9,5 | 7,8 | 1,7 | 0,82 |
| *Fairhaven* | 8,4 | 6,2 | 2,2 | 0,74 |
| *Southland* | 5,4 | 4,1 | 1,3 | 0,76 |
| *Nectared 6* | 8,5 | 6,6 | 1,9 | 0,78 |
| *P. Babygold 6* | 11,8 | 10,4 | 1,4 | 0,88 |
| *Michelini* | 9,0 | 7,2 | 1,8 | 0,80 |
| *J. H. Hale* | 6,7 | 5,1 | 1,6 | 0,76 |
| *Shipper's late red* | 8,2 | 6,4 | 1,8 | 0,78 |
| *Rubidoux* | 8,8 | 7,0 | 1,8 | 0,80 |

TABLEAU 4

*Répartition du glucose et du fructose chez quelques cultivars de pêches*
(D'après SWEENEY *et al.*, 1970)
(Résultats en g p. 100 g)

| Variétés | Fructose | Glucose | Saccharose | Gl/Fr | Sa/ST |
|---|---|---|---|---|---|
| *Redhaven* | 1,17 | 1,06 | 4,58 | 0,9 | 0,67 |
| *Golden Jubilée* | 1,22 | 1,24 | 5,34 | 1,0 | 0,68 |
| *Triogem* | 0,92 | 0,85 | 5,99 | 0,9 | 0,77 |
| *Golden East* | 0,87 | 0,83 | 7,17 | 1,0 | 0,81 |
| *Belle Georgia* | 1,46 | 1,32 | 7,67 | 0,9 | 0,73 |
| *Elberta* | 1,27 | 1,27 | 7,09 | 1,0 | 0,74 |
| *Kimbo* | 1,10 | 1,22 | 7,70 | 1,1 | 0,77 |

Le moyen simple d'évaluer la teneur en sucres d'une Pêche consiste à faire usage du réfractomètre. Cet appareil, généralement gradué en saccharose, indique l'extrait sec soluble, ou extrait réfractométrique ; il donne une idée des constituants solubles des jus, mais ne tient pas compte des constituants insolubles qui se rencontrent fréquemment dans les jus pulpeux. Cependant, dans le cas où la proportion de jus est importante, et la quantité de constituants solubles forte, il y a corrélation entre l'indication du réfractomètre et le résultat du dosage chimique des sucres. De telles

corrélations s'observent dans la figure 1 pour des analyses effectuées lors de deux campagnes assez différentes entre elles du point de vue climatique. Les corrélations sont bonnes :

$$r = 0{,}96 \text{ en } 1966$$
$$r = 0{,}80 \text{ en } 1969$$

bien que chaque point représente une variété différente, soit du groupe des pêches à noyau libre, soit de celui des pêches *Pavies*.

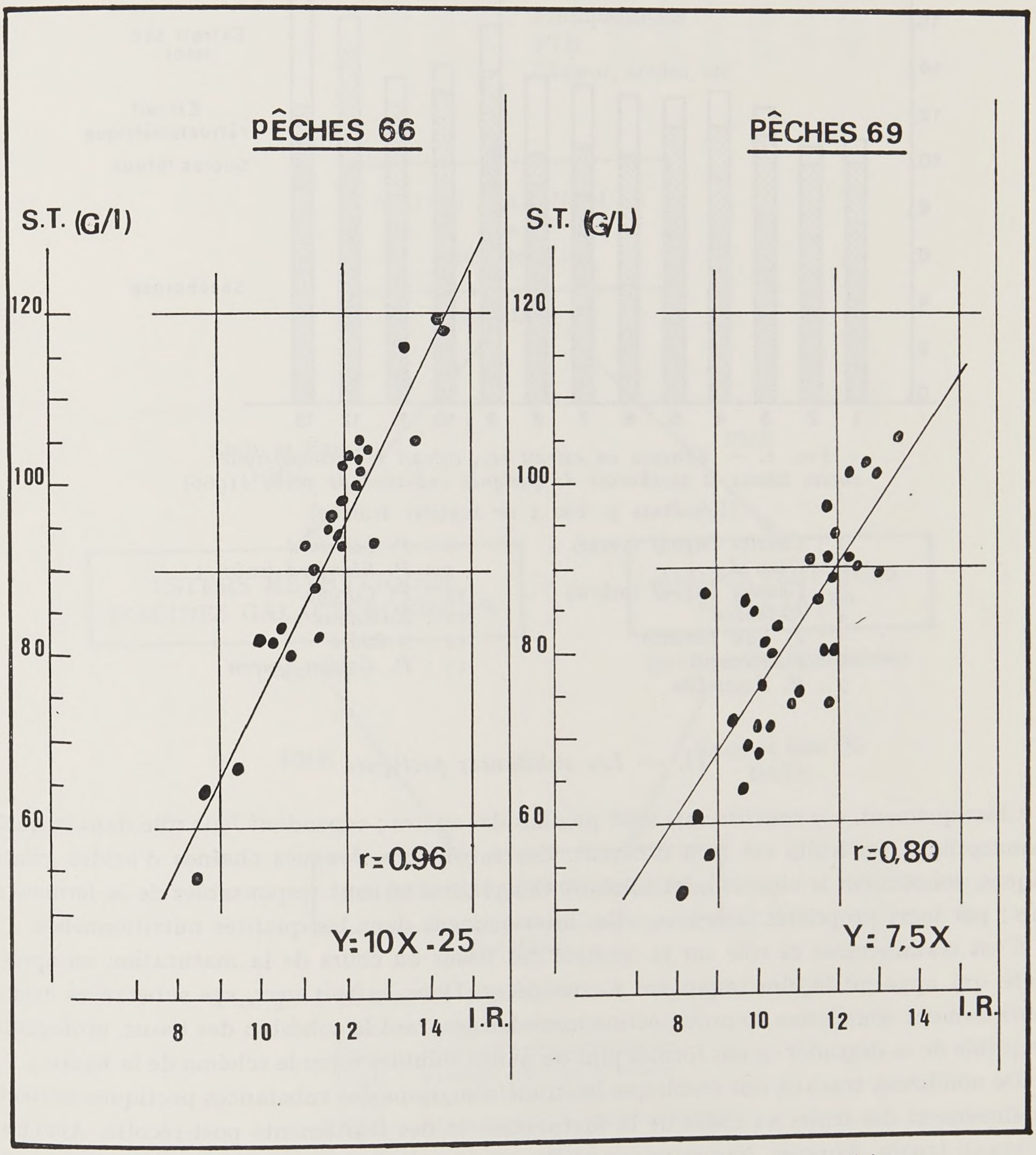



FIG. 1. — *Corrélations entre l'indice réfractométrique et les sucres totaux dans un certain nombre de cultivars de pêches*
(Campagnes 1966 et 1969)

Les différences variétales apparaissent dans la figure 2 dans laquelle sont représentés, pour diverses variétés :

— l'extrait sec total,
— l'extrait réfractométrique,

— les sucres totaux,
— le saccharose,

chacun de ces constituants étant calculé pour 100 g de matière fraîche.

L'examen du tableau 1 et de la figure 2 permettent de constater que l'extrait sec total des variétés est d'autant plus important que le fruit est de maturité tardive.

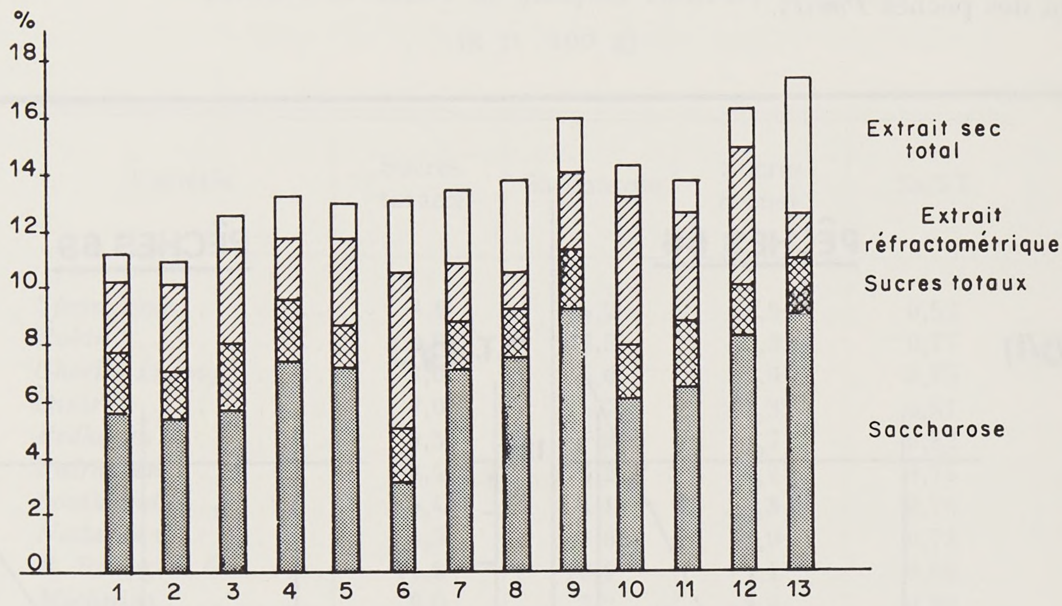



FIG. 2. — *Teneurs en extrait sec, extrait réfractométrique, sucres totaux et saccharose de quelques cultivars de pêche* (1966)
(Résultats p. 100 g de matière fraîche)

1 : *Charles Ingouf* (verte)
2 : *Dixired*
3 : *Charles Ingouf* (mûrie)
4 : *Redhaven*
5 : *P. San Lorenzo*
6 : *P. Vesuvio*
7 : *P. Escarolita*
8 : *P. Stanford*
9 : *P. Stanford* (mûrie)
10 : *P. Corona*
11 : *Rubidoux*
12 : *S 305.1*
13 : *P. Golden Queen*

## II. — *Les substances pectiques*

Chimiquement, ces constituants sont proches des sucres ; cependant leur rôle dans la qualité organoleptique des fruits est bien différent. Ces substances, longues chaînes d'acides galacturoniques, constituent le ciment intercellulaire des plantes et sont responsables de la fermeté des tissus ; par leurs propriétés laxatives, elles interviennent dans les qualités nutritionnelles.

C'est certainement ce rôle sur la fermeté des tissus au cours de la maturation ou après la récolte qui apparaît le plus important à considérer. Dans le fruit vert, ces substances existent essentiellement sous forme de protopectine insoluble assurant la cohésion des tissus, protopectine susceptible de se dégrader en des formes plus ou moins solubles selon le schéma de la figure 3.

De nombreux travaux ont établi que les transformations des substances pectiques causent le ramollissement des fruits au cours de la maturation et des traitements post-récolte. APPLEMAN et CONRAD (1926), ADDOMS, NIGHTINGALE et BLAKE (1930), ALLEN (1932), étudiant ces transformations, avaient déjà utilisé des tests de pression pour mesurer la diminution de la fermeté des pêches. Les travaux plus récents de POSTLMAYR, LUH et LEONARD (1956), de SHEWFELT (1965), intéressant la maturation des pêches à noyau libre et celle des pêches *Pavies*, ont mis en évidence que la fermeté de la chair de ces dernières était liée à leur teneur élevée en protopectines ne se solubilisant pratiquement pas au cours de la maturation, contrairement à ce qui se produit dans le cas des pêches à noyau libre. Lors d'un premier inventaire, nous avons pu confirmer ce fait (SOUTY *et al.*, 1967 *a*). La figure 4 montre les différences variétales qui existent entre les teneurs en pectines totales et entre les proportions relatives des pectines solubles et insolubles (protopectines).

Des tests de fermeté sont souvent utilisés comme critères de maturité, la fermeté étant liée à l'évolution des substances pectiques des fruits : le parallélisme de ces deux phénomènes est parfaitement confirmé par leur étude au cours de la maturation. La figure 5 en est l'illustration.

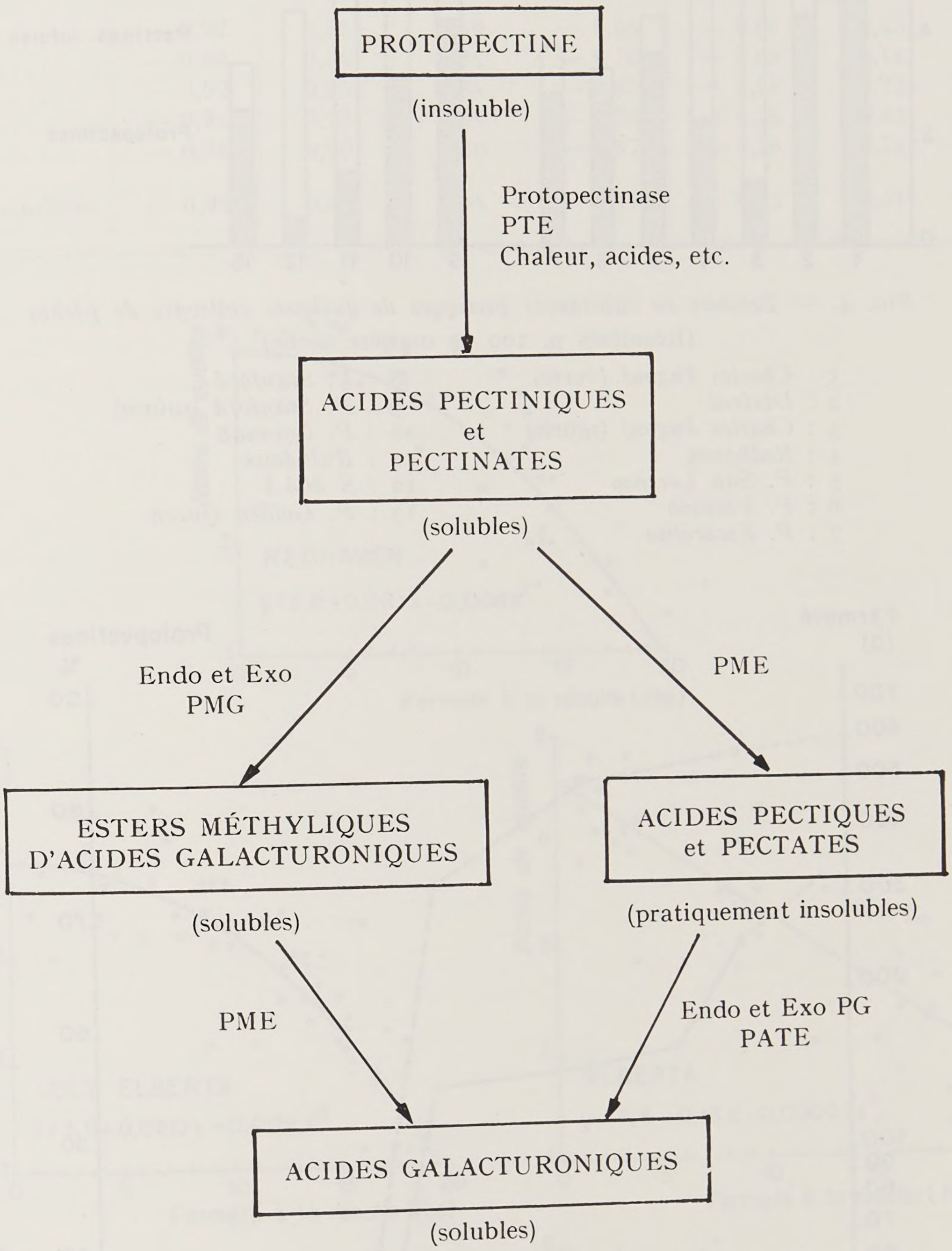



FIG. 3. — *Schéma de dégradation des substances pectiques*

PG : Polygalacturonase
PMG : Polyméthylgalacturonase
PME : Pectine méthyl estérase
PTE : Pectine *trans*-éliminase
PATE : Acide pectique *trans*-éliminase

La validité des tests de fermeté est confirmée par de nombreux auteurs. Ainsi ROOD (1957), recherchant pour cinq variétés de pêches les corrélations entre indices de maturité à la récolte et qualité finale des fruits, a montré que ce sont les mesures de fermeté qui présentent le meilleur coefficient de corrélation (tabl. 5).

Cependant cet auteur signale que de telles corrélations ne sont linéaires que pour les variétés les plus tardives (fig. 6) et qu'il s'avère nécessaire de réaliser ces tests dans des conditions bien définies.

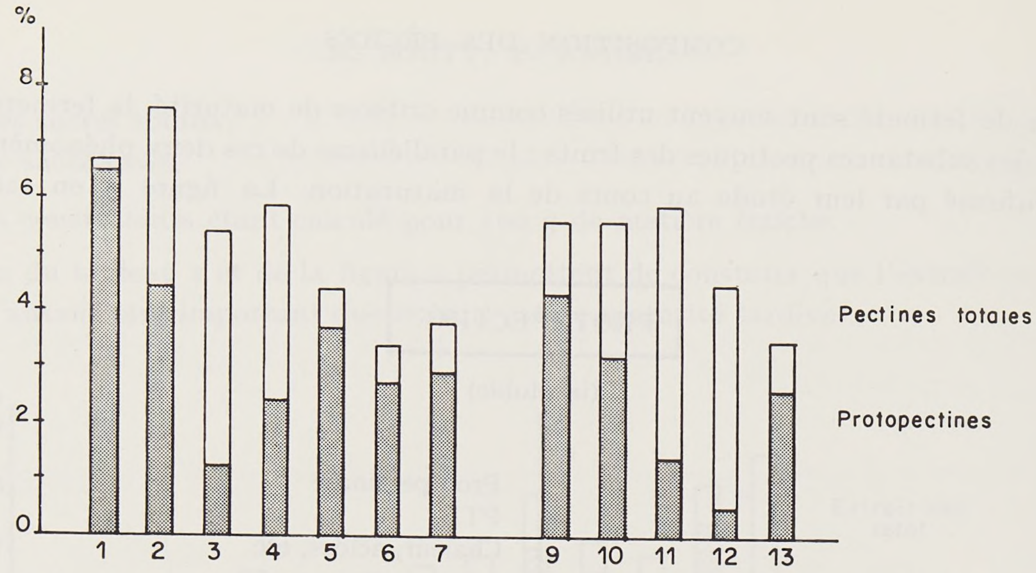



FIG. 4. — *Teneurs en substances pectiques de quelques cultivars de pêches*
(Résultats p. 100 de matière sèche)

1 : *Charles Ingouf* (verte)
2 : *Dixired*
3 : *Charles Ingouf* (mûrie)
4 : *Redhaven*
5 : *P. San Lorenzo*
6 : *P. Vesuvio*
7 : *P. Escarolita*
8 : *P. Stanford*
9 : *P. Stanford* (mûrie)
10 : *P. Corona*
11 : *Rubidoux*
12 : *S 305.1*
13 : *P. Golden Queen*

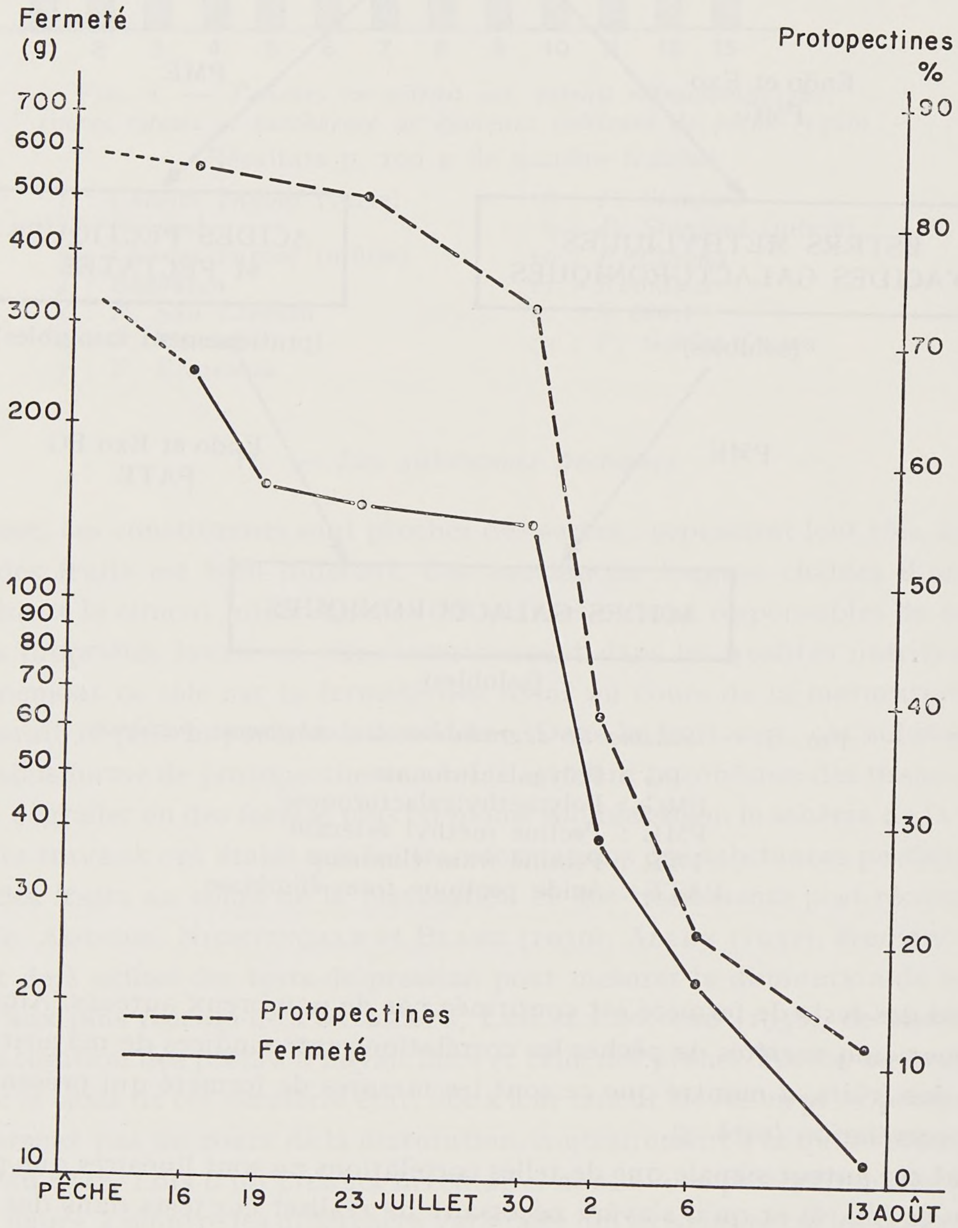



FIG. 5. — *Évolution de la fermeté et de la teneur en protopectine au cours de la maturation d'une pêche, cv.* Fairhaven

TABLEAU 5. — *Coefficients de corrélation entre indices de maturité de pêches au moment de la récolte, et la qualité des fruits au moment de leur consommation* (d'après ROOD, 1957)

| Cultivar | Test de pression | Couleur de fond de la peau | Couleur de la chair | Chlorophylle | Acidité titrable | Indice réfractométrique | Rapport AT/IR |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *Redhaven* | — 0,92 | 0,81 | 0,69 | — 0,66 | — 0,66 | 0,43 | — 0,72 |
| *July Elberta* | — 0,93 | 0,84 | 0,84 | — 0,76 | — 0,68 | 0,18 | — 0,57 |
| *Elberta* | — 0,92 | 0,85 | 0,84 | — 0,85 | — 0,84 | 0,22 | — 0,83 |
| *J. H. Hale* | — 0,91 | 0,93 | 0,94 | — 0,76 | — 0,76 | 0,39 | — 0,81 |
| *Rio oso gem* | — 0,94 | 0,90 | 0,80 | — 0,87 | — 0,76 | 0,74 | — 0,79 |
| Moyenne pondérée. | — 0,93 | 0,87 | 0,84 | — 0,79 | — 0,75 | 0,41 | — 0,75 |

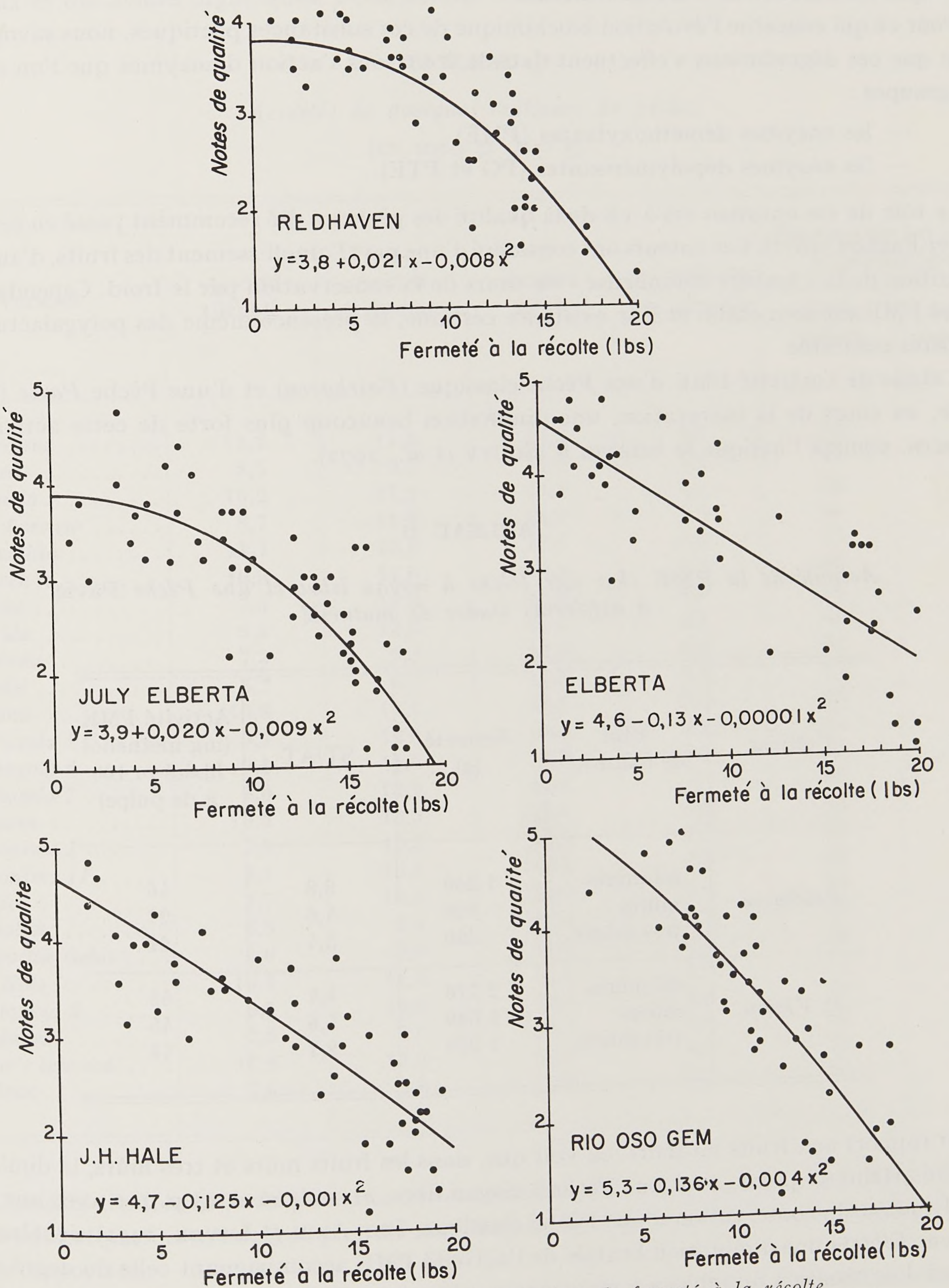



FIG. 6. — *Corrélations entre les mesures de fermeté à la récolte et les notes de qualité des fruits à la consommation* (d'après P. ROOD 1957)

Le test de mesure de fermeté (pénétrométrie) est largement utilisé, bien que test destructeur du fait de la blessure qu'il occasionne au fruit, et bien que les mesures doivent être effectuées sur un échantillon de fruits relativement important. Différentes solutions ont été proposées pour réduire ces inconvénients. L'une des plus récentes est la miniaturisation de l'embout du pénétromètre utilisé (Monet, Bastard et Campoy, 1974) permettant de répéter la mesure sur le même fruit au cours de son développement.

La détermination de la fermeté peut s'opérer par d'autres procédés. Finney (1971) détermine l'atténuation de la transmission des vibrations acoustiques pour des pêches entières et montre qu'il existe une corrélation satisfaisante avec les mesures de fermeté pour des fréquences convenablement choisies. Monet (1972) a tenté d'utiliser l'évolution de la résistivité. Ces derniers tests fournissent de bons renseignements au laboratoire, ils sont toutefois de mise en œuvre délicate ou réclament un appareillage onéreux. Ils sont donc encore difficilement transposables dans la pratique courante de la Station fruitière.

Pour ce qui concerne l'évolution biochimique de ces substances pectiques, nous savons maintenant que ces dégradations s'effectuent dans le fruit sous l'action d'enzymes que l'on classe en deux groupes :

— les enzymes déméthoxylantes (PME)
— les enzymes dépolymérisantes (PG et PTE).

Le rôle de ces enzymes vis-à-vis de la qualité des pêches a été récemment passé en revue par Pech et Fallot (1972). Ces auteurs ont considéré d'une part l'amollissement des fruits, d'autre part l'apparition de la « texture cotonneuse » au cours de la conservation par le froid. Cependant, si le rôle des PME est bien établi et leur existence certaine, la présence même des polygalacturonases est parfois contestée.

L'étude de l'activité PME d'une Pêche classique (*Fairhaven*) et d'une Pêche *Pavie* (*Vivian*) montre, au cours de la maturation, une diminution beaucoup plus forte de cette activité avec *Fairhaven*, comme l'indique le tableau 6 (Souty *et al.*, 1972).

TABLEAU 6

*Activité de la PME chez une Pêche à noyau libre et une Pêche* Pavie *à différents stades de maturité*

| Cultivar | État de maturité | Fermeté (g) | ST/AT | Activité PME (mg méthanol libéré p. 100 g de pulpe) |
|---|---|---|---|---|
| *Fairhaven* | mi-mûres | 1 260 | 3,8 | 46 |
| | mûres | 820 | 4,6 | 27 |
| | très mûres | 330 | 5,4 | 21 |
| *P. Vivian* | mi-mûres | 2 710 | 4,4 | 55 |
| | mûres | 1 680 | 5,6 | 45 |
| | très mûres | 1 250 | 8,1 | 48 |

Par rapport aux fruits mi-mûrs, on voit que, dans les fruits mûrs et très mûrs, la diminution d'activité atteint 50 p. 100 avec une Pêche à noyau libre, et seulement 15 p. 100 avec une Pêche *Pavie*. Étudiant la conservation d'une Pêche classique, Ben Arie et Lavee (1971) signalent chez le cultivar *Elberta* une diminution brutale de l'activité PME accompagnant celle du degré d'estérification. Les résultats du tableau 6 montrant que l'activité PME ne diminue pas chez les *Pavies*,

la déméthoxylation des acides pectiniques n'aurait pas lieu, et l'attaque des enzymes dépolymérisantes ne pourrait pas se faire, ce qui expliquerait la moindre solubilisation des protopectines de ce type de fruits, et par voie de conséquence la moindre diminution de leur fermeté. Cette hypothèse peut être rapprochée de celle émise par Monet (1967) envisageant que « dans le cas du mutant *Pavie* il est raisonnable de penser que le gène muté induit la formation d'une hydrolase anormale incapable de catalyser l'hydrolyse des protopectines ».

Des investigations apparaissent encore nécessaires pour élucider totalement cette différence entre pêches à noyau libre et pêches *Pavies*.

### III. — *L'acidité et les acides organiques*

L'acidité totale est pour la Pêche, comme pour les autres fruits, constituée par des acides minéraux et des acides organiques. Cette acidité varie considérablement selon les cultivars.

TABLEAU 7

*Acidités de quelques cultivars de pêches*
(en meq p. 100 g)

| Variétés | Acidité titrable | Acidité organique | Acidité totale | Ac. malique / Ac. citrique | Pourcentage par rapport à l'acidité totale | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | Acidité titrable | Acidité organique |
| *P. Cherryred* | 13,2 | 14,1 | 16,2 | 1,6 | 82 | 87 |
| *Redhaven* | 8,5 | 9,2 | 11,0 | 1,6 | 77 | 84 |
| *P. Vesuvio* | 10,2 | 11,2 | 13,9 | 1,7 | 73 | 81 |
| *P. San Lorenzo* | 8,7 | 11,7 | 13,3 | 3,2 | 65 | 88 |
| *P. Escarolita* | 11,7 | 13,0 | 15,7 | 1,9 | 75 | 83 |
| *Fairhaven* | 10,5 | 11,0 | 12,9 | 1,2 | 81 | 85 |
| *P. Shasta* | 7,5 | 11,3 | 13,5 | 4,0 | 56 | 84 |
| *P. Farida* | 9,4 | 12,3 | 14,5 | 3,8 | 65 | 85 |
| *P. Fortuna* | 7,3 | 9,3 | 11,2 | 6,2 | 65 | 83 |
| *P. Loadel* | 8,2 | 9,1 | 11,0 | 5,1 | 75 | 83 |
| *Southland* | 10,8 | 11,1 | 13,5 | 1,3 | 80 | 82 |
| *P. Babygold 5* | 9,3 | 12,0 | 13,8 | 3,1 | 67 | 87 |
| *P. Babygold 6* | 9,1 | 11,5 | 13,2 | 4,8 | 69 | 87 |
| *P. Babygold 7* | 8,0 | 12,9 | 14,4 | 3,2 | 56 | 90 |
| *P. Tuscan* | 10,2 | 13,3 | 15,1 | 1,5 | 68 | 88 |
| *P. Jeronimo I* | 7,5 | 10,5 | 13,5 | 2,7 | 56 | 78 |
| *P. Jeronimo II* | 7,1 | 10,1 | 12,2 | 2,9 | 58 | 83 |
| *P. Tudor* | 7,7 | 10,9 | 13,0 | 4,6 | 59 | 84 |
| *P. Carolyn* | 6,3 | 9,3 | 11,0 | 7,5 | 57 | 85 |
| *P. Roquetta Gelat* | 6,8 | 9,9 | 11,7 | 5,7 | 58 | 85 |
| *J. H. Hale* | 10,7 | 11,6 | 14,4 | 1,2 | 74 | 81 |
| *P. Babygold 9* | 9,5 | 10,6 | 13,6 | 4,1 | 70 | 78 |
| *P. Sudanell* | 7,3 | 9,6 | 11,7 | 3,8 | 62 | 82 |
| *Shipper's late red* | 11,8 | 12,9 | 15,6 | 1,9 | 76 | 83 |
| *Rubidoux* | 7,6 | 9,6 | 10,8 | 4,1 | 70 | 89 |

L'acidité titrable, celle le plus souvent considérée, représente l'acidité libre : de ce fait l'acidité totale est parfois nettement plus élevée. Dans le tableau 7, les acidités de quelques cultivars ont été rapportées.

Les quantités respectives des acidités libre et organique, par rapport à l'acidité totale, varient

considérablement selon les cultivars, ce qui prouve que dans certains d'entre eux la proportion de cations minéraux neutralisant une partie de cette acidité est relativement importante.

L'acidité organique est due à plusieurs acides du cycle de Krebs. La figure 7 représente les chromatogrammes des acides organiques d'une Pêche, acides séparés respectivement sur gel de silice et sur résine échangeuse d'anions.

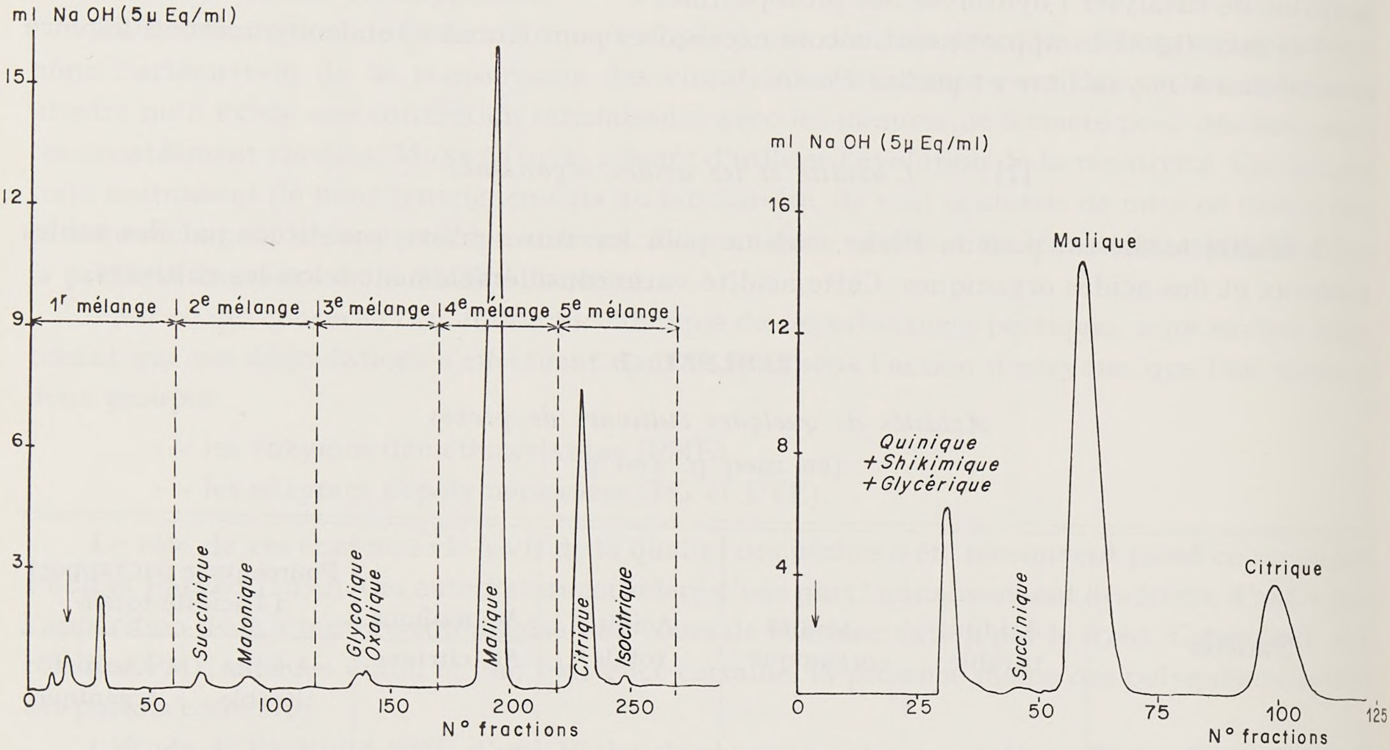



Fig. 7. — *Chromatogrammes des acides organiques stables d'une pêche, cv.* Rubidoux

Chromatogramme des acides organiques des pêches de la var. *Rubidoux*
(Séparation sur gel de silice)

Chromatogramme des acides organiques des pêches de la var. *Rubidoux*
(Séparation sur résine Dowex I)

Les principaux acides ainsi décelés sont :

— les acides quinique, shikimique et glycérique,
— l'acide succinique,
— l'acide glycolique,
— l'acide malonique,
— l'acide malique,
— l'acide citrique,
— l'acide isocitrique.

La proportion des acides quinique et shikimique, intermédiaires probables chez certaines plantes entre le métabolisme aliphatique et aromatique, mais surtout responsables de certains goûts amers (Hulme, 1958 ; Boudet *et al.*, 1967) varie, selon les variétés et les conditions de culture, de 10 (Souty *et al.*, 1967) à 25 p. 100 de l'acidité organique (Anet et Reynolds, 1953 ; Sweeney *et al.*, 1970).

Les acides malique et citrique sont considérés comme les acides les plus importants des pêches, mais leurs quantités respectives peuvent varier dans des proportions notables. Le tableau 7 montre que le rapport de ces deux acides (exprimés en milliéquivalents) varie, pour des fruits récoltés dans un même verger, de 1,2 à 7,5. Certains auteurs ont même signalé des rapports inférieurs à 1. Sweeney mentionne des variétés telles que :

— *Golden Jubilée* : mal/cit = 0,69 en meq (0,74 en poids).
— *Halehaven* : mal/cit = 0,83 en meq (0,86 en poids).

Ce fait avait également été signalé par PEYNAUD (1947) :

— *Carman* : mal/cit = 0,67 } en meq.
— *Pavie Red Bird* : mal/cit = 0,85 }

Au cours de la maturation, la concentration de l'acide malique (par rapport à l'acidité totale) augmente alors que celle de l'acide citrique diminue, comme il apparaît dans le tableau 8.

TABLEAU 8

*Évolution des acides malique et citrique selon le stade de maturité chez la Pêche*
(Résultats calculés en meq)

| Source | Variété | Stade de maturité | Acide malique / Acidité totale | Acide citrique / Acidité totale | Acide malique / Acide citrique |
|---|---|---|---|---|---|
| (1) | *Coronet* | mi-verte<br>mûre<br>très mûre | 28,5<br>54,0<br>74,9 | 70,9<br>45,1<br>23,2 | 0,4<br>1,2<br>3,2 |
| (1) | *Southland* | mi-verte<br>mûre<br>très mûre | 37,5<br>50,7<br>63,6 | 61,7<br>48,6<br>35,6 | 0,6<br>1,0<br>1,8 |
| (2) | *P. Vesuvio* | mi-verte<br>mûre<br>très mûre | 49,0<br>50,8<br>55,9 | 29,7<br>29,2<br>25,2 | 1,6<br>1,7<br>2,2 |

(1) LI et WOODROOF, 1968.
(2) SOUTY *et al.*, 1967 *b*.

SWEENEY *et al.* (1970), recherchant les corrélations entre différents constituants biochimiques et les jugements des dégustations, se sont intéressés particulièrement à l'indice réfractométrique (IR), l'acidité de titration (AT), les sucres totaux (ST) et le pH. Ils donnent les résultats suivants :

| Variable | pH | ST | IR | IR/AT |
|---|---|---|---|---|
| Corrélation *r* | 0,76* | NS | NS | 0,61* |

* : Significatif à 1 p. 100.
NS : Non significatif.

Une bonne corrélation ne se rencontre donc qu'avec le pH et le rapport IR/AT.

Certains auteurs admettent que la saveur de l'acide malique est plus persistante que celle de l'acide citrique (SAUSVILLE, 1965). Les résultats de SWEENEY *et al.* indiquent cependant une faible différence de flaveur entre *Golden East* et *Golden Jubilée*, cultivars dont les rapports respec-

tifs mal/cit étaient cette année-là de 3,33 et 0,75 exprimés en meq, (ou 3,56 et 0,79 en poids). Mais, le fait, souvent constaté, que les fruits riches en acide malique paraissent plus « plats » que ceux riches en acide citrique, peut expliquer que *Golden East* ait été classée après *Golden Jubilée*. On admet en effet que la saveur de l'acide citrique apparaît avant celle de l'acide malique, et qu'elle atteint un niveau plus élevé, mais qu'elle est moins persistante comme le montre la figure 8 (GARDNER, 1966).

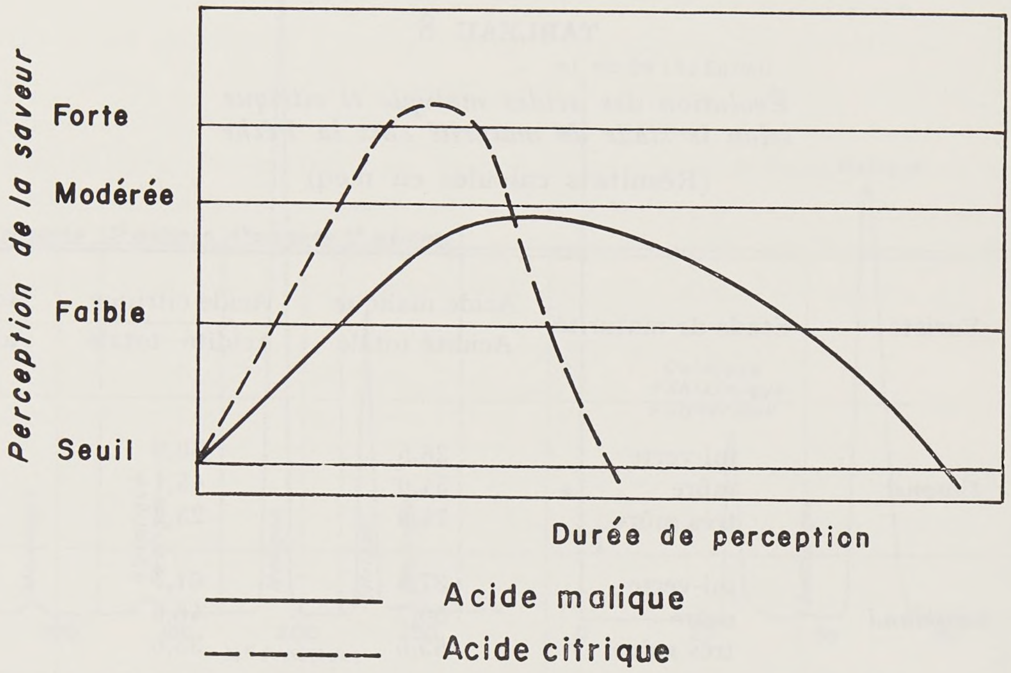



FIG. 8. — *Courbes de perception* (intensité et persistance) *de la saveur des acides malique et citrique* (d'après W. H. GARDNER, 1966)

L'acide citrique, à poids égal, suscite donc une saveur acide moins accentuée que celle de l'acide malique. Mais l'acide malique se rencontre en réalité dans les fruits davantage sous forme salifiée que l'acide citrique. Si nous examinons (fig. 9) la relation entre le pourcentage d'acidité libre titrable et le rapport malique/citrique des fruits de quelques cultivars, nous constatons que, parmi les fruits étudiés, ceux qualifiés de « riches » en acide citrique (rapport mal/cit compris entre 1 et 2) ont une acidité libre de titration élevée par rapport à l'acidité totale (entre 72 et 82 p. 100), alors que, parmi les fruits riches en acide malique, cette acidité libre est généralement plus faible. Ceci explique l'impression moins acide que l'on ressent à la dégustation d'un fruit à prédominance malique.

## IV. — *Les constituants de l'arôme*

L'arôme d'un fruit est un critère important de qualité. C'est généralement le résultat du mélange de plusieurs substances plus ou moins volatiles telles que esters, aldéhydes, cétones, alcools, terpènes, lactones, etc.

L'arôme de la Pêche fait l'objet de nombreux travaux. En 1921, POWER et CHESNUT avaient déjà identifié des esters du linalol à côté d'acétaldéhyde et de furfural. Depuis le développement de la chromatographie en phase gazeuse, les études se sont multipliées, et la liste des constituants responsables de l'arôme s'est allongée. LIM (1963), étudiant plusieurs cultivars, montre que certains d'entre eux, tels *Red Globe*, sont nettement plus riches en constituants organiques que d'autres. JENNINGS et SEVENANTS (1964), puis SEVENANTS et JENNINGS (1966) signalent pour la première fois la présence d'une série de lactones, principalement des gamma lactones, et leur attribuent l'arôme caractéristique de la Pêche. BRODERICK (1966) signale de nouvelles lactones, et d'autres substances, en plus des constituants déjà isolés précédemment. DO, SALUNKHE et

Olson (1969) séparent, à partir du cultivar *Gleason early Elberta*, 86 constituants dont la majeure partie est identifiée. La figure 10 est un exemple de chromatogramme d'essence de pêche (Broderick, 1966).

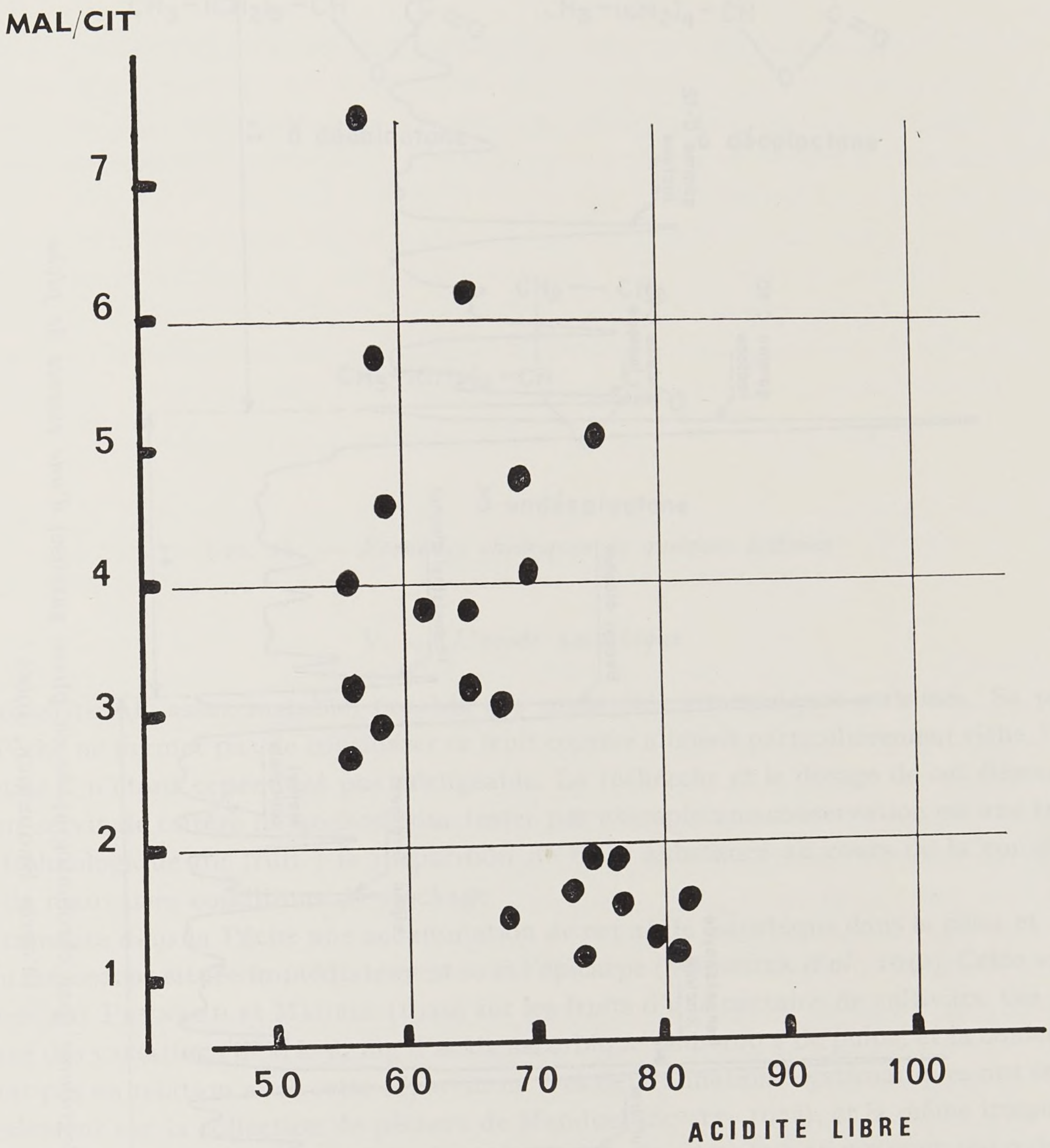



Fig. 9. — *Relation entre le pourcentage d'acidité libre titrable* (par rapport à l'acidité totale) *et le rapport des acides malique et critique chez quelques cultivars de pêches*

Les lactones sont souvent considérées comme les constituants typiques de l'arôme de pêche. Il est remarquable cependant qu'aucune des lactones trouvées dans la Pêche n'a, isolément, mis à part peut-être la gamma décalactone, l'odeur caractéristique de ce fruit : cet arôme est la combinaison de plusieurs groupes de composés. L'undécalactone, longtemps considérée comme un ingrédient essentiel des essences synthétiques de pêches, et de ce fait appelée « aldéhyde de pêche », n'a cependant encore jamais été isolée dans les fruits naturels. La gamma décalactone possèderait l'odeur caractéristique de pêche, alors que la delta décalactone rappellerait plutôt l'odeur typique de la noix de coco. Les formules chimiques de ces trois composés (fig. 11) montrent des structures assez proches, et c'est dans ces substances difficiles à isoler et à doser qu'il faut chercher l'existence de certains signes qualitatifs caractéristiques des cultivars ou des traitements subis par les fruits.

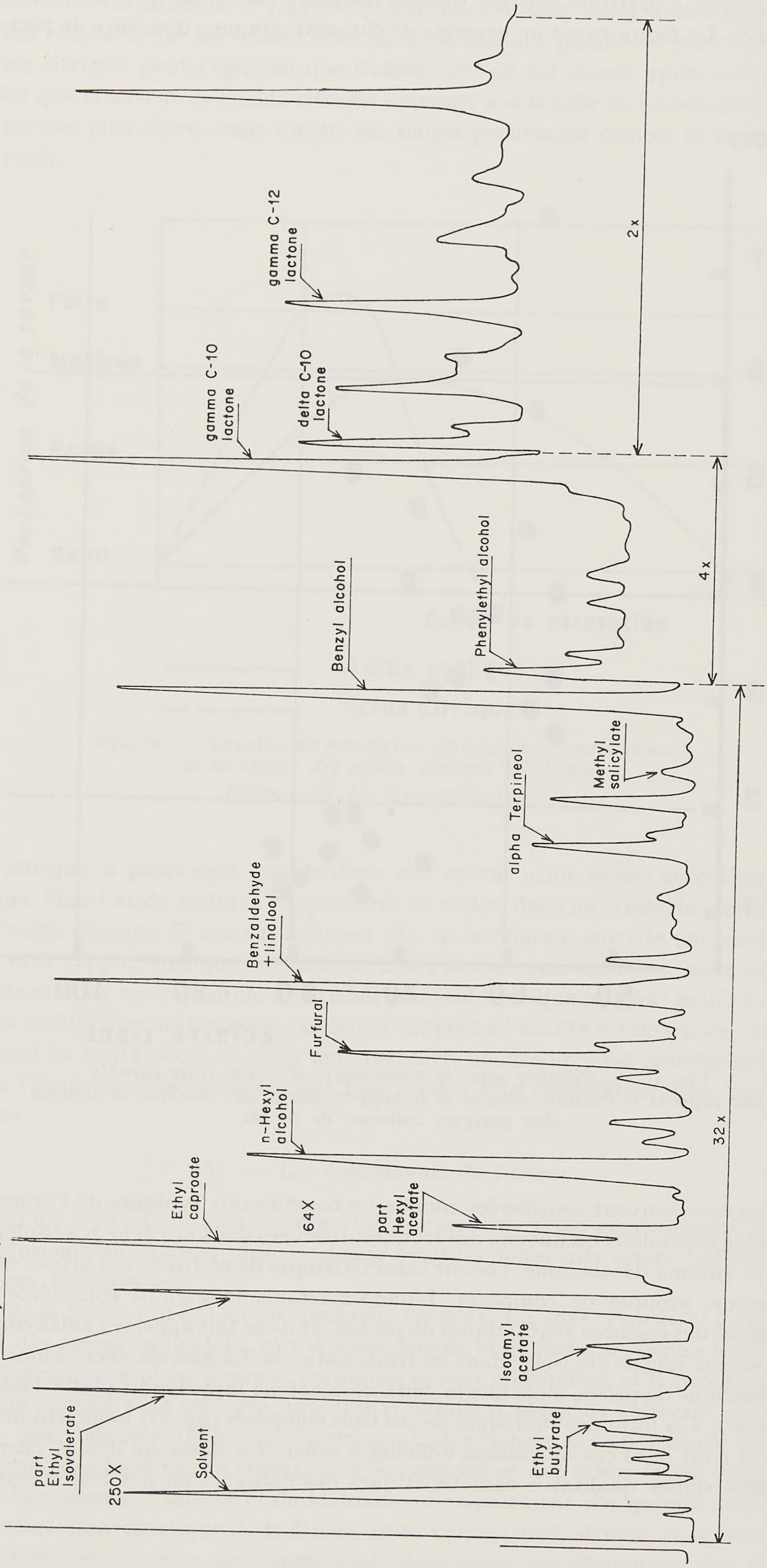
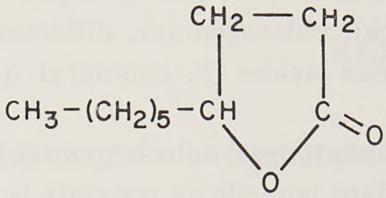
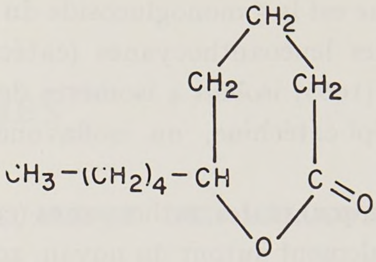


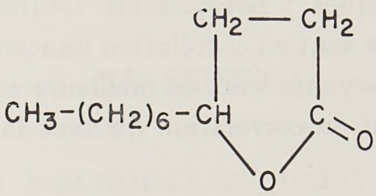

FIG. 10. — *Chromatogramme* (par chromatographie en phase gazeuse) *d'une essence de pêche* (d'après BRODERICK, 1966)



γ décalactone



δ décalactone



γ undécalactone

Fig. 11. — *Formules chimiques de quelques lactones*

## V. — *L'acide ascorbique*

Ce constituant, assez instable, possède des propriétés vitaminiques certaines. Sa présence dans la Pêche ne permet pas de considérer ce fruit comme aliment particulièrement riche, l'apport en vitamine C n'étant cependant pas négligeable. La recherche et le dosage de cet élément peut également servir de critère de qualité pour tester par exemple une conservation ou une transformation technologique du fruit : la disparition de cette substance au cours de la conservation indique de mauvaises conditions de stockage.

On constate dans la Pêche une accumulation de cet acide ascorbique dans la peau et dans la partie du mésocarpe située immédiatement sous l'épicarpe (Schroder *et al.*, 1942). Cette vitamine a été dosée par Peynaud et Maurie (1949) sur les fruits d'une centaine de cultivars. Ces auteurs ont trouvé des variations de 6 à 59 mg d'acide ascorbique pour 100 g de pulpe, et la couleur de la chair n'est pas en relation avec cette répartition. Des déterminations systématiques ont été effectuées également sur la collection de pêchers de Manduel (Souty, 1972), et la même irrégularité a été retrouvée ; les valeurs moins élevées que nous indiquons alors (7 à 16 mg pour 100 g de pulpe) s'expliquent par la méthode de dosage employée (Genevois, 1972) : la méthode utilisée par nous, méthode de Roe et Oesterling, ne dose en effet à froid que l'acide ascorbique libre, alors que Peynaud et Genevois, en procédant après une courte hydrolyse à chaud, dosaient par le dichlorophénol indophénol un taux plus élevé de substances réductrices.

## VI. — *Les substances colorées et polyphénoliques*

Deux types de substances colorées se rencontrent dans la Pêche : des substances polyphénoliques et des hydrocarbures.

Les hydrocarbures sont représentés par les caroténoïdes, responsables en particulier de la couleur jaune de la chair de certaines variétés. Curl (1959) a mis en évidence essentiellement des xanthophylles. Récemment Lessertois (1972) étudiant les fruits de la variété *Earliglo* trouve un mélange de 14 caroténoïdes répartis en deux groupes : des carotènes et des xanthophylles époxydés.

Les substances polyphénoliques comprennent des anthocyanes, des leucoanthocyanes, des flavonols. Van Blaricom et Senn (1967) signalent, pour 9 cultivars étudiés, que le principal consti-

tuant anthocyanique est le 3 monoglucoside du cyanidol. HSIA *et al.* (1964) et JOSLYN et DITTMAR (1967) indiquent des leucoanthocyanes (catéchine et acides chlorogéniques) et des proanthocyanes. LUH *et al.* (1967) isolent 4 isomères de l'acide chlorogénique, différents leucocyanidines, la catéchine et l'épi-catéchine, un isoflavone, deux acides *p.* coumaryl quinique et l'acide caféique.

Au regard de la qualité, les anthocyanes (colorants rouges) sont responsables de la coloration de la chair, principalement autour du noyau, zone dans laquelle on constate la plus forte concentration en pigments. Les leucoanthocyanes, ou tanins, sont responsables de l'astringence des fruits verts ou mal nourris et des brunissements de la chair (oxydation des acides chlorogéniques par la polyphénoloxydase notamment).

LI *et al.* (1972) cherchant à établir des corrélations entre la couleur, la flaveur, et les trois groupes de substances polyphénoliques : polyphénols totaux, leucoanthocyanes et flavonols, indiquent que les polyphénols totaux sont en corrélation hautement significative à la fois avec la flaveur et la couleur ; les leucoanthocyanes sont en meilleure corrélation avec la couleur qu'avec la flaveur, mais les flavonols ne sont en corrélation qu'avec la couleur.

## CONCLUSION

Cette revue rapide des principaux constituants du fruit mûr nous montre que de très nombreux facteurs influent sur la qualité gustative, et l'on comprend ainsi que le problème de l'obtention d'une « bonne » qualité gustative soit complexe.

Les progrès de nos connaissances réalisés au cours de ces dernières années permettent, au niveau de certains éléments, d'intervenir soit sur leur présence ou leur absence, soit sur leur évolution au cours de la maturation ou de la conservation. Cependant, dans plusieurs domaines, ces connaissances sont encore incomplètes, notamment en ce qui concerne la formation des arômes : c'est pourquoi nos recherches doivent tendre à maîtriser tous les facteurs régissant les qualités gustatives et nutritionnelles.

L'obtention d'une « bonne qualité gustative » est liée à la composition biochimique des fruits, mais n'est pas le seul facteur de qualité, car de nombreuses sollicitations extérieures peuvent la modifier ; d'où la nécessité d'un travail coordonné entre producteurs, chercheurs, techniciens et distributeurs. Il est de bon augure cependant de constater qu'une telle coordination semble prendre vigueur, laissant ainsi présager un avenir où la « qualité » ne devrait cesser de s'améliorer.

*Reçu pour publication en mars 1975.*

## SUMMARY

### QUALITY AND PEACHES CONSTITUENTS

In this review, we regard the major constituents as they affect quality in peaches : water and salts, sugars, pectic substances, organic acids, flavour constituents, ascorbic acid, coloured substances and polyphenols.

Examples are given, particularly for sugars, pectic substances and organic acids, only on varietal differences, and not on cultural influences ; their role on quality is discussed.

## RESUMEN

### COMPOSICIÓN BIOQUÍMICA Y CUALIDAD DEL MELOCOTÓN

Se reseña los principales constituyentes bioquímicos del melocotón. Se dan algunos ejemplos de su repartición varietal, particularmente en lo que concierne los azúcares, los acidos orgánicos y las substancias pécticas y se discute su influencia sobre la cualidad.

## RIASSUNTO

### COMPOSIZIONE BIOCHIMICA E QUALITÀ DELLA PESCA

I principali constituanti biochimici della pesca sono passati in rassegna. Alcuni esempi sono dati sulla loro ripartizione varietale, particolarmente per quanto riguarda gli zuccheri, gli acidi organici e le sostanze pestice, e il loro ruolo sulla qualitá e discusso.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ADDOMS R. M., NIGHTINGALE G. T., BLAKE M. A., 1930. Development and ripening of peaches as correlated with physical characteristics, chemical composition and histological structure of the fruit flesh. II. Histology and microchemistry. *New Jersey Agric. Exper. Stn. Bull.*, n° 507, 3-16.

ALLEN F. W., 1932. Physical and chemical changes in the ripening of deciduous fruits. *Hilgardia*, **6**, 381-441.

ANET E. F. L. J., REYNOLDS T. M., 1953. Isolation of l-quinic acid from the peach fruit. *Nature*, **172**, 1188-1189.

APPLEMAN C. O., CONRAD C. M., 1926. Pectic constituents of peaches and their relation to softening of the fruit. *Maryland Univ. Exper. Stn. Bull.*, n° 283.

BEN ARIE R., LAVEE S., 1971. Pectic changes occuring in *Elberta* peaches suffering from woolly breakdown. *Phytochemistry*, **10**, 531-538.

BOUDET A., GADAL P., ALIBERT G., MARICO G., 1967. Recherches sur la biosynthèse et le métabolisme des composés aromatiques chez les végétaux supérieurs. Mise en évidence de précurseurs alicycliques chez *Quercus pedunculata*. *C. R. Acad. Sci.*, **265**, Série D, 119-122.

BRODERICK J. J., 1966. What is important in peach flavor? *Amer. Perfum.*, **81**, 43-45.

CAUSERET J., 1960. In *La valeur alimentaire et thérapeutique des fruits et légumes*. OECE Projet 7/10-C, 117.

CHATT E. M., 1966. The mineral constituents of fruits. *Brit. Foot, Manuf. Ind. Res. Ass. Scient. and Techn.*, Surveys n° 45.

CURL A. L., 1959. The carotenoids of cling peaches. *Food Res.*, **24**, 413-422.

DO J. Y., SALUNKHE D. K., OLSON L. E., 1969. Isolation, identification and comparison of the volatils of Peach fruit as related to harvest maturity and artificial ripening. *J. Food Sci.*, **34** (6), 618-621.

FINNEY E. E., Jr., 1971. Random vibrations techniques for non destructive evaluation of peach firmness. *J. agr. Engng.*, **16** (1), 81-87.

Food Ind. Manual, 1958. Chemical Pub. Co., Inc. New York.

GARDNER W. H., 1966. Food acidulants. *Allied Chem. Corp.* New York.

GENEVOIS L., 1972. Qualité nutritionnelle des fruits à noyau. *Qual. Plant. et Mat. Veg.*, **21** (3), 203-221.

GENEVOIS L., PEYNAUD E., 1947. Composition de 16 variétés de pêches. *Rev. Hort.*, **30**, 295-298.

HSIA C., CLAYPOOL L. L., ABERNETHY J. L., ESAU P., 1964. Leucoanthocyan material from immature peaches. *J. Food. Sci.*, **29**, 723-729.

HULME A. C., 1958. Quinic and shikimic acids in fruits. *Qual. Plant. et Mat. Veg.*, 468-473.

JENNINGS W. G., SEVENANTS H. R., 1964. Volatile components of peaches. *J. Food Sci.*, **29**, 796-801.

JOSLYN M. A., DITTMAR H. F. K., 1967. Die Proanthocyanidine von *Fay-Elberta* Pfirsichen. *Mitt. Kloster*, **17** (3), 227-233.

LESSERTOIS D., 1972. Étude préliminaire sur la séparation et la caractérisation des caroténoïdes du fruit mûr de pêcher (Var. *Earliglo*). D. E. A., Paris.

LI K. C., WOODROOF J. G., 1968. Gas chromatographic resolution of non volatile organic acids in peaches. *J. agr. Food Chem.*, **16** (3), 534-535.

LI K. C., BOGGESS T. C. Jr., HEATON E. K., 1972. Relationship of sensory ratings with tanins components of canned peaches. *J. Food Sci.*, **37**, 177-178.

LIM Lily, 1963. Thèse University Californie, Davis.

LUH B. S., HSU E. T., STACHOWICZ, 1967. Polyphenolic compounds in canned cling peaches. *J. Food Sci.*, **32**, 251-258.

MONET R., 1967. Le caractère *Pavie*. Conceptions génétique et biochimique actuelles. *Bull. Techn. Inf.*, n° 220, 429-431.

MONET R., 1972. C. R. Groupe Travail Qualité Pêches.

MONET R., BASTARD Y., CAMPOY B., 1974. Étude de la variation de la dureté du fruit *in situ* chez le pêcher. *Ann. Techn. agric.*, **23** (1), 39-51.

PECH J.-C., FALLOT J., 1972. Les enzymes et la qualité des pêches. *Ann. Techn. agric.*, **21** (1), 81-93.

PEYNAUD E., 1948. L'acide ascorbique dans les pêches. *Rev. Hort.*, **31**, 69-73.

PEYNAUD E., 1950. Sur la composition chimique des pêches. *Ann. agron.*, (6), 775-791.

PEYNAUD E., MAURIE A., 1949. La vitamine C dans les fruits à noyau de la récolte 1949. *Rev. Hort.*, **33**, 24-2 et 52-53.

POSTLMAYR H. L., LUH B. S., LEONARD S. J., 1956. Characterization of pectic changes in freestone and clingstone peaches during ripening and processing. *Food Technol.*, **10** (12), 618-625.

ROOD P., 1957. Development and evaluation of objective maturity indices for *California* freestone peaches. *Am. Soc. Hort. Sci.*, **70**, 104-112.

SAUSVILLE T. J., 1965. A new look at the acidulant malic acid. *Food Technol.*, (3), 367-368.

SEVENANTS M. R., JENNINGS W. G., 1956. Volatile components of peaches. II. *J. Food Sci.*, **31**, 81-86.

SHEWFELT A. L., 1965. Changes and variations in the pectic constitution of ripening peaches as related to product firmness. *Food Sci.*, **30**, 573-576.

SCHRODER G. M., SATTERFIELS G. M., HOMES A. D., 1942. The influence of variety size and degree of ripeness upon the ascorbic acid content of peaches. *J. Nutrit.*, **25**, 503-509.

SOUTY M., 1972. La Vitamine C dans les pêches destinées à la conserve. *Qual. Plant. et Mat. Veg.*, **21**, 223-228.

SOUTY M., PERRET A., ANDRE P., 1967 *a*. Premières observations sur quelques variétés de pêches destinées à la conserve. *Ann. Techn. agric.*, **16**, 55-68.

SOUTY M., POGGI A., BREUILS L., 1967 *b*. Données techniques intéressant la technologie des pêches de conserve : connaissance du matériel végétal. *Bull. Techn. Inf.*, (220), 505-522.

SOUTY M., ANDRE P., POGGI A., BREUILS L., 1970. Caractéristiques et problèmes technologiques des pêches *Pavies* utilisées pour la conserve (oreillons au sirop). *Bull. Techn. Inf.*, (276), 39-46.

SOUTY M., BREUILS L., JACQUEMIN G., RASPAIL M., 1972. C. R. Groupe de Travail Qualité Pêches.

SWEENEY J. P., CHAPMAN V. J., HEPNER P. A., 1970. Sugar, acid and flavor in fresh fruits. *J. am. Diet. Assoc.*, **57**, 432-435.

THIAULT J., 1970. Étude de critères objectifs de la qualité gustative des pommes *Golden Delicious*. *Bull. Techn. Inf.*, n° 248, 191-201.

ULRICH R., 1952. *La vie dez fruits*, Masson Édit. Paris.

VAN BLARICOM L. O., SENN T. L., 1967. Anthocyanin pigments in freestone peaches grown in the South-east. *Amer. Soc. Hort. Sci.*, **90**, 541-545.

# RECOMMANDATIONS AUX AUTEURS

Le manuscrit doit être dactylographié sur papier format 21 × 29,7, avec un double interligne, au recto seulement. Chaque page sera numérotée et des feuilles *séparées* seront utilisées pour les références bibliographiques, les tableaux, les légendes des figures et graphiques, etc.

*Au début de chaque mémoire*, on indiquera : — *le titre du mémoire :* il ne devra pas comporter d'abréviations ni de formules chimiques (sauf pour les isotopes) ; — *le nom des auteurs*, précédé des initiales du prénom pour les hommes, du prénom complet pour les femmes ; — *le nom des techniciens* ayant collaboré à l'étude relatée, précédé de la mention : avec la collaboration technique de... ; — *le nom de l'établissement*, dans lequel ont été effectuées les recherches et son adresse.

*Les mémoires* seront rédigés, autant que possible, d'après le plan ci-dessous :
a) *résumé* (250 mots max.) suffisamment précis pour que sa lecture renseigne sur la nature du travail et son importance ; b) *introduction* dans laquelle on indique l'objet des recherches entreprises en relation avec les travaux déjà effectués dans le domaine ; c) *techniques expérimentales et matériel utilisé*, en donnant, sous une forme concise, tous les détails nécessaires pour que le lecteur puisse répéter les expériences ; d) *résultats*, à présenter de la manière la plus brève possible ; e) *discussion et conclusions ;* f) *titre et résumé* en anglais ou destinés à être traduit en anglais comportant une analyse *complète* de l'article ; g) *remerciements* pour les collaborations, les fonds, les dons... ; h) *références bibliographiques.*

*Les travaux originaux en anglais* doivent présenter la même composition que les mémoires rédigés en français, mais ils comportent obligatoirement un résumé français *très complet.* Les figures, graphiques tableaux et photographies seront sous-titrés en français.

*Pour les autres documents* (notes, mises au point, revues, rapports, etc.) l'auteur devra suivre un plan logique et le mettre en évidence par une titration appropriée.

*Les références bibliographiques* doivent être citées dans le texte de la manière suivante : (DUPONT et DUVAL, 1954). Lorsque la référence comporte plus de trois auteurs, seul le premier auteur sera mentionné suivi de *et al.* A la fin de l'article, les références constituant la bibliographie doivent être citées par ordre alphabétique des noms d'auteurs, et par ordre de dates pour un même auteur.

*Pour les articles :* le (s) nom (s) de (s) auteur (s) suivi (s) des initiales du (des) prénom (s) ; la date de parution de l'article ; le titre de l'article (dans la langue originale pour l'allemand, l'anglais, l'italien, l'espagnol et en français dans tous les autres cas, avec indication entre parenthèses de la langue d'origine, sauf si l'auteur étranger a sous-titré dans l'une des quatre langues mentionnées) ; le titre du périodique en abrégé, selon la *World List of Scientific Periodicals*, ou le *Bulletin Signalétique du C. N. R. S.* ; le volume ; la première et la dernière page de l'article.

*Pour les ouvrages :* le nom de l'auteur avec les initiales du prénom ; la date de l'édition ; le titre complet de l'ouvrage dans la langue originale, sans abréviations (pour les langues utilisant des alphabets autres que l'alphabet latin, la traduction du titre sera donnée entre parenthèses, avec mention de la langue d'origine) ; le volume ; la première et la dernière page du paragraphe se rapportant aux résultats discutés et, si l'on cite l'ouvrage en entier, le nombre de volumes et le nombre total de pages ; le numéro de l'édition s'il y en a plusieurs ; le nom de l'éditeur ; le lieu de l'édition. Si l'ouvrage est collectif, on indiquera en plus le nom de l'auteur du chapitre cité, le nom des rédacteurs principaux, précédé de la mention « in », le titre de l'ouvrage.

La mention de « communications personnelles » ou « données non publiées » etc. doit être faite entre parenthèses. Lorsque l'auteur a relevé une référence dans une revue d'« Abstracts », le mentionner à la fin de la référence, entre parenthèses.

*Les tableaux, dessins, graphiques, cartes, photographies, doivent être fournis à part.* Les tableaux et figures doivent faire l'objet de deux numérotations distinctes, en chiffres arabes l'une et l'autre.

Les auteurs peuvent disposer leurs tableaux soit dans le sens de la largeur de la revue, soit dans le sens de la longueur. Dans le sens de la largeur, le total des signes et des espaces disponibles est de 100. Dans le sens de la longueur, il est de 155. Les tableaux en longueur, c'est-à-dire ceux pouvant disposer de 155 signes, ne seront admis que s'ils comprennent plus de 8 lignes de chiffres, de manière qu'une page entière de la revue ne soit pas occupée par un tableau très long et très étroit. Les graphiques ne doivent pas faire double emploi avec les tableaux.

Les légendes et les énoncés des graphiques et dessins doivent être dactylographiés sur une même feuille séparée et porter les numéros des figures.

*Les graphiques, schémas, cartes, dessins d'appareils* seront envoyés soit *à l'état définitif* soit *à l'état de projets*, leur exécution définitive étant confiée au Bureau de Dessin de l'I. N. R. A. Seules deux réductions à l'impression sont admises : *soit* × 0,5, *soit* × 0,25.

Il est rappelé que le format utile des *Annales* est : 12,5 × 19,5 cm ; ces dimensions ne doivent pas être dépassées.

*Photographies :* Il est recommandé de fournir des épreuves bien contrastées sur papier blanc, et de préférence en format 9 × 12. Si les photographies doivent être associées pour constituer des planches, on adoptera les normes suivantes : 2 photos : 9 × 12 ; 4 photos : 9 × 5,5 ; 6 photos : 5,5 × 5,5. Dans ce cas, chaque photo devra porter un numéro en chiffres arabes visible après clichage.

Les légendes des photographies doivent être dactylographiées sur une même feuille séparée et porter les numéros des figures.

Il est demandé d'indiquer sur le manuscrit, dans la marge, en regard du texte, l'emplacement souhaité des tableaux et figures.

*Envoi du manuscrit :* M^me^ COLLON, Station d'Œnologie et de Technologie végétale, 11104 Narbonne, ou M. DUPUY, Chef du Département de Technologie des Produits végétaux, Centre de Recherches de Dijon, 21034 Dijon Cedex. On demande deux exemplaires.

*Correction des épreuves :* les épreuves que les auteurs recevront à corriger sont à retourner, après correction, à M^me^ COLLON.

TECHNOLOGIE AGRICOLE.

*Le Directeur de la publication:* M.-L. Cagnac

Imprimerie Bussière à Saint-Amand (Cher), France. — 2-1976

*Dépôt légal: 1er trimestre 1976. N° d'impression: 1659*

CPPAP n° 26375

# annales de technologie agricole

Trimestriel

1975

Vol. 24 . N° 3-4

SYMPOSIUM INTERNATIONAL SUR LE RHUM
ET ALCOOLS DERIVÉS DE LA CANNE A SUCRE

Antilles Françaises
5 au 11 Mai 1975

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

Reproduction, même partielle, interdite sans autorisation des auteurs
et de l'Institut national de la Recherche agronomique
à l'exception des résumés

**Symposium International sur le Rhum et Alcools dérivés de la Canne à sucre**
**Antilles Françaises**
**5 au 11 Mai 1975**

## INTRODUCTION

Le Symposium sur le Rhum, les Alcools et Boissons alcooliques dérivées de la Canne à sucre s'est déroulé du 5 au 11 mai 1975 aux Antilles françaises. Il était organisé par l'Institut national de la Recherche agronomique et l'Association pour la Promotion des Industries agricoles.

Cette première réunion internationale sur les Rhums entrait dans le cadre des Symposia internationaux patronnés par l'International Union of Food Science and Technology.

Ce Symposium a réuni 200 participants originaires de pays producteurs de rhum et aussi de pays consommateurs. Les 22 communications publiées dans les Annales de Technologie agricole de l'I.N.R.A constituent la mise à jour la plus récente de nos connaissances dans ce domaine. Elle sera utile à tous ceux qui s'intéressent aux problèmes posés par la production d'alcools de canne à sucre.

P. Dupuy.
*Chef du Département,*
*Technologie des Produits végétaux.*

*Ann. Technol. agric.*, 1975, **24** (3-4), 239-245.

# LESS VOLATILE ALCOHOLS, ESTERS AND HYDROCARBONS IN A RAW AUSTRALIAN RUM

D. A. ALLAN

*Millaquin Sugar Co LTD, P. O. 536,*
*Bundaberg, OLD 4670 (Australie)*

## SUMMARY

A novel source of appreciable amounts of the volatile compounds in rum is described. Examination of the concentrate so produced permitted the positive identification of a number of organic compounds, including 1,1,6-trimethyl-1,2-dihydronaphthalene, heptan-1-ol, heptan-2-ol, 4-methylpentan-1-ol, (—) oct-1-en-3-ol, methyl salicylate and a number of fatty acid esters. The work was carried out on raw rum, *i. e.* rum before maturation. Some of the compounds identified were previously considered to be formed during maturation.

## INTRODUCTION

MAARSE and TEN NOEVER (1966) ; LIEBICH, KOENIG, BAYER (1970) extracted mature Jamaican rums with pentane-ether and analysed the extracts using gas chromatography-mass spectrometry and infra red spectrometry. The latter workers identified over 200 compounds. Since a g.c.-m.s. system was not available to the author for the work, the pentane-ether extracts even of many gallons of raw rum (rum that had not yet been matured in wooden vats for 2 years) were too small to allow individual compounds to be easily isolated and identified using infra red, ultra violet and proton magnetic resonance spectroscopy and by making derivatives. Consideration of the industrial process used in the Bundaberg distillery suggested an alternative method of producing concentrates for analysis.

## EXAMINATION OF THE INDUSTRIAL PROCESS

Fermentation of molasses forms the starting point for the production of both Bundaberg rum and industrial alcohol. The yeast and fermentation conditions were chosen to suit the production of rum, the alcohol is only a by-product. The compounds present in rum which are absent from industrial alcohol must be removed from the alcohol still in the side streams. Distillery oil, removed in litre quantities from the side of the still was shown to contain these compounds and can be considered as a concentrate of higher boiling point flavour compounds of rum. This was confirmed by showing that gas chromatograms of distillery oil and pentane-ether extracts of raw rum were identical.

Fractional distillation of distillery oil produced « fusel oil » containing the higher alcohols (*n*-propanol, isobutanol, isoamyl alcohol and active amyl alcohol, BP to 132°C) and a residue termed « rum » oil containing compounds with a higher boiling point than isoamyl alcohol. Only the analysis of the « rum » oil will be discussed.

## RESULTS AND DISCUSSIONS

### A. — *Distillation and analysis of « rum » oil*

The « rum » oil (500 ml) was distilled in a LECKY and EWELL (1942) still. The fractions that were gas chromatographically impure were redistilled in a BOWER and COOKE (1943) still. Many of the compounds listed in table 1 were then positively identified by IR, PMR spectrometry, by preparation of derivatives and by synthesis.

### B. — *Hydrolysis of distillery oil*

Since the major compounds were esters, 1 litre of « rum » oil was prepared and hydrolysed with sodium hydroxide to concentrate the remaining compounds. A gas chromatogram of this hydrolysate on 10 ft Carbowax 20M at 100°C produced sixteen (16) significant peaks (fig. 1). The hydrolysate was fractionally distilled and the fractions analysed. From figure 1, it can be seen that all of the compounds producing peaks are alcohols except for those which comprised peak 16. The major compound in peak 16 was identified by synthesis and analysis in a mass spectrometer as 1,1,6-trimethyl-1,2-dihydronaphthalene. The alcohols with boiling points lower than pentan-1-ol were produced wholly by hydrolysis of esters present in the original distillery oil.

### C. — *Other compounds present in « rum » oil*

A group of nitrogen compounds was isolated using the HCl extraction method of WOBBEN (1971), but the volume of the extract was too small to be analysed by conventional means. Although LIEBICH (1970) identified many acetals, none were

identified in the « rum » oil, possibly due to their instability during distillation of the acidic distillery oil to remove the fusel oil. Raw rum contained at least 50 p.p.m. of 1,1-diethoxyethane and this concentration increased in mature rum. As this and other compounds more volatile than isoamyl alcohol did not occur in « rum » oil, they are not listed in table 1.

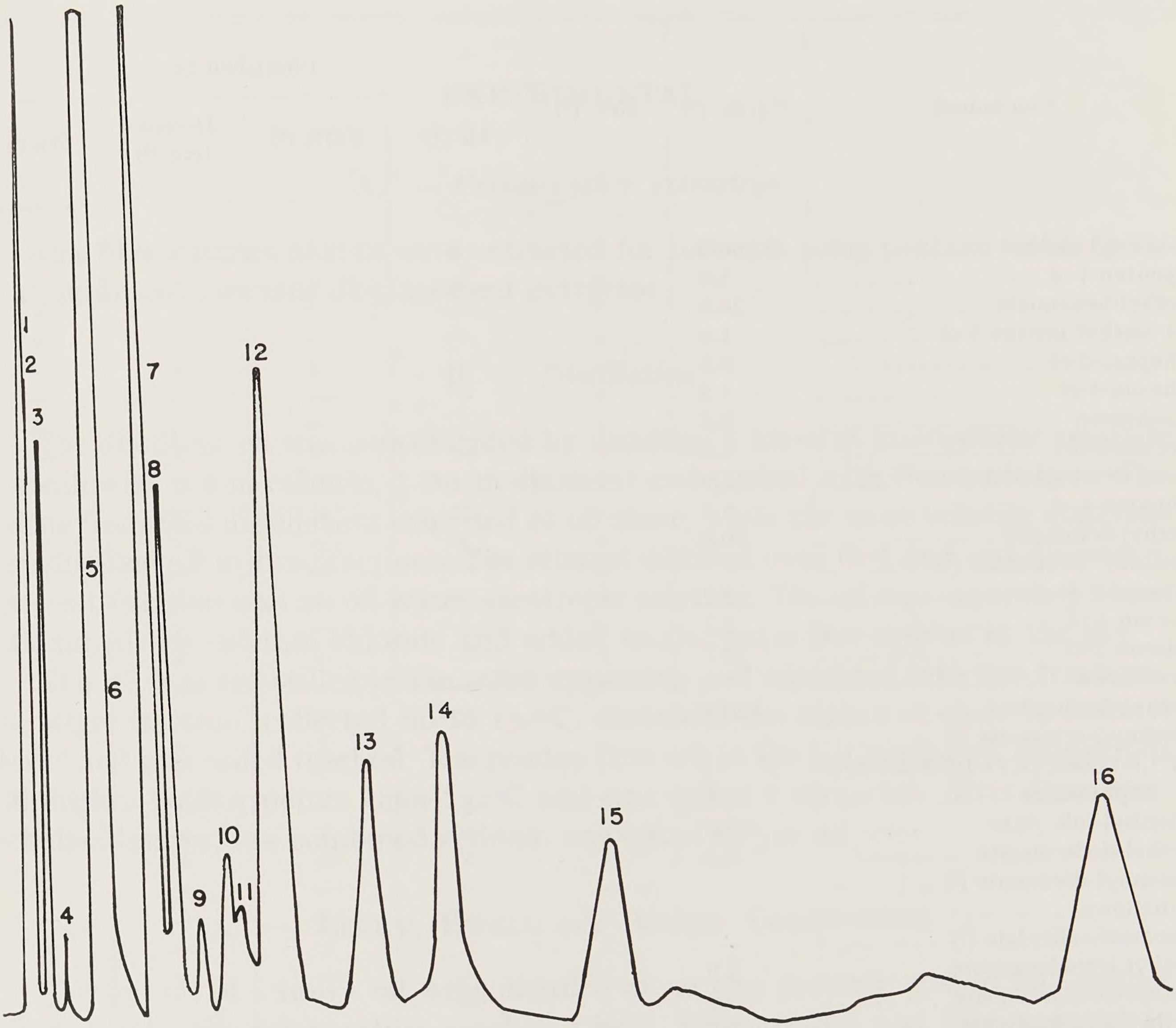



FIG. 1. — *Gas chromatogram of hydrolysed « rum » oil*

Column : 10ft Carbowax 20M ; Temperature : 100°C

1 : Ethanol + methanol
2 : *n*-propanol
3 : Isobutanol
4 : Butan-1-ol
5 : Isoamyl + Active Amyl Alcohols
6 : Pentan-1-ol (*)
7 : Heptan-2-ol
8 : Hexan-1-ol
9 : Unknown Alcohol
10 : Octan-2-ol
11 : Unknown Alcohol
12 : Heptan-1-ol
13 : Nonan-2-ol
14 : Octan-1-ol
15 : Decan-2-ol
16 : 1,1,6-trimethyl-1,2-dihydronaphthalene

## D. — *Conclusions*

All of the compounds listed in table 1, other than several of the secondary alcohols, in particular, (—) oct-1-en-3-ol, exist in mature Jamaican rum (LIEBICH, 1970). However, the concentrations of many of the flavour compounds are considerably

(*) Peak clearly visible in original g. c.

TABLE I

*Compounds in « rum » oil*

| Compound | P.p.m. (1) | Ret. (2) | Identified by | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | IR (3) | PMR (4) | Derivative (5) | Syn (6) |
| isoamyl alcohol | 1 000.0 | × | × | × | × | — |
| pentan-1-ol | 1.0 | × | × | × | — | — |
| ethyl-hexanoate | 20.0 | × | — | — | × | × |
| 4-methyl-pentan-1-ol | 1.0 | × | — | — | × | × |
| heptan-2-ol | 6.5 | × | × | × | × | — |
| hexan-1-ol | 1.3 | × | — | — | × | — |
| unknown | 0.5 | × | — | — | — | — |
| octan-2-ol | 1.0 | × | — | × | × | — |
| (—) oct-1-en-3-ol | 15.0 | × | × | × | × | × |
| heptan-1-ol | 4.2 | × | × | × | × | — |
| ethyl-octanoate | 50.0 | × | × | × | × | × |
| isoamyl hexanoate (7) | | × | — | — | — | × |
| nonan-2-ol | 2.2 | × | — | × | × | — |
| octan-1-ol | 2.7 | × | — | — | × | — |
| decan-2-ol | 3.7 | × | — | × | × | — |
| unknown | | × | — | — | — | — |
| ethyl-decanoate | 130.0 | × | × | × | × | — |
| isoamyl-octanoate (7) | | × | × | × | × | — |
| 1,1,6-trimethyl-1,2-dihydronaphthalene | 5.0 | × | × | × | — | × |
| methyl-salicylate | 25.0 | × | × | × | × | × |
| ethyl-dodecanoate | 5.0 | × | × | × | × | × |
| isoamyl-decanoate (7) | | × | × | — | × | × |
| unknown | | × | — | — | — | — |
| isoamyl-salicylate (7) | | × | × | × | — | × |
| ethyl-tetradecanoate | 5.0 | × | — | — | — | × |
| ethyl-hexadecanoate | 5.0 | × | — | — | — | × |
| ethyl-octadecanoate | 5.0 | × | — | — | — | × |
| benzyl-alcohol | | × | — | — | — | — |
| β-phenyl-ethyl-alcohol | | × | — | — | — | × |

(1) P.p.m. : parts per million parts of rum (68 p. 100) alcohol by volume.
(2) (*i*) Gas chromatographis retention times checked on TCEP, Carbowax 20M, Carbowax 600 and FFAP.
(*ii*) Compounds found by retention time only cannot claim to be positively identified.
(3) Infra red spectrometry.
(4) Proton magnetic resonance spectrometry.
(5) The ester fractions were hydrolysed and a derivative made of the acid.
(6) Synthesized.
(7) Transesterification during distillery oil distillation increased the isoamyl esters concentration.

different from those of Bundaberg rum. In particular, ethyl decanoate, methyl salicylate and 1,1,6-trimethyl-1,2-dihydronaphthalene are much more concentrated in raw Bundaberg rum. It must be noted that gas chromatograms of mature and raw rum extracts of Bundaberg rum are very similar, indicating little change in concentration, but no doubt very significant flavour enhancement during maturation.

## EXPERIMENTAL

### A. — *Pentane-ether extraction*

One litre batches of rum were extracted for 10 hours using pentane- ether (2 : 1) in a continuous upwards displacement extractor.

### B. — *Distillation*

The distillery oil was concentrated by distilling 5 litres at atmospheric pressure in a still with a 1 m column, 7 cm in diameter and packed with Fenske helices. The residue from this distillation consisted of oil alone, while the more volatile materials were distilled off in two fractions. The ethanol distilled over first and was discarded. The next fraction was an oil-water azeotropic mixture. The oil was separated, dried with anhydrous calcium chloride and added to the water-free residue in the pot.

This oil was redistilled in the same apparatus and separated into two fractions. The larger fraction, collected up to 132°C, contained the higher alcohols to isoamyl alcohol and was called fusel oil. The residue (100 ml) in the pot contained compounds with higher boiling points than 132°C and was called « rum » oil. After four more such distillations, the combined residues amounted to 500 ml.

### C. — LECKY, EWELL *and* BOWER, COOKE *stills*

The 500 ml of « rum » oil were distilled at 50 mm pressure and 10 ml samples collected until the temperature reached 129°C. The pressure was then reduced to 10 mm and more fractions removed until the temperature reached 126°C. Several combined fractions (15-30 ml) were redistilled in the BOWER, COOKE (1943) still.

### D. — *Oct-1-en-3-ol identification*

I.R. spectrum contained peaks at 3.300, 1.620, 1.440, 970 and 900 cm$^{-1}$, indicating that the compound was an alcohol with a terminal double bond. The following tests established that the alcohol was (—) oct-1-en-3-ol.

1. Optically active : $[\alpha]_D^{25}$ = —3.2° for 5 p. 100 in chloroform.

2. P.m.r. spectrum contained peaks at 0.85, 1.28, 3.7 and 3.96 p.p.m. due respectively to hydrogen on the terminal methyl group, methylenes, hydroxyl group and the carbon to which the hydroxyl was attached. A series of ten peaks from 4.85 to 6.2 p.p.m. with an intensity of 3 protons was due to the ABX system $—CH{=}CH_2$.

3. Oxidation by MORTON's (1948) active manganese dioxide in hexane produced oct-1-en-3-one.

4. Reduction with Raney nickel catalyst produced 3-octanol which was identified by comparison with an authentic sample of 3-octanol made by the GRIGNARD reaction on *n*-amyl bromide and propanol.

5. Synthesis of oct-1-en-3-ol (MURAHASHI's alcohol) (1937) by the GRIGNARD synthesis using *n*-amyl bromide and acrolein and using the experimental technique given in Vogel.

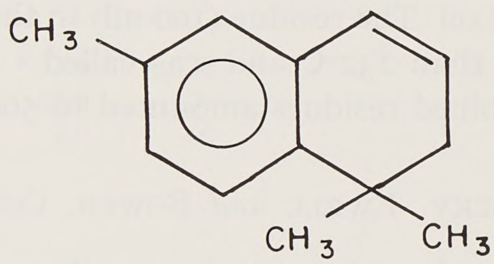
E. — *Hydrolysis of « rum » oil*

The « rum » oil was hydrolysed in 300 ml lots with 500 ml of 20 p. 100 sodium hydroxide. The mixtures were refluxed and stirred with a magnetic stirrer for 48 hours. The compounds formed were extracted into ether.

F. — *1,1,6-trimethyl-1,2-dihydronaphthalene identification*

The ethyl decanoate fraction from the initial distillation of the « rum » oil contained 2 p. 100 of this compound. It was purified by hydrolysis of the ethyl decanoate, steam distillation of the hydrolysate, fractional distillation and purification by absorption on a column of aluminium oxide (activity 2). It was also isolated from hydrolysed « rum » oil.

The u.v. spectral characteristics were $\varepsilon = 9100$, $\lambda_{max} = 261$ cm$^{-1}$. The i.r. spectrum showed no functional groups. The p.m.r. spectrum gave significant peaks at 1.25 and 2.2 p.p.m. and multiplet peaks at 2.1, 5.4-6.2 and 6.5-7.0 p.p.m. The compound was deduced to be 1,1,6-trimethyl-1,2-dihydronaphthalene.




*Synthesis.*

1,1,6-trimethyl-1,2-dihydronaphthalene was first produced by TIEMANN (1898) as a minor product during the production of ionene by the condensation of ionone with hydrogen iodide and red phosphorous. BOGERT and FOURMANN (1933) produced ionene by condensing ionene with iodide. This latter method was used and produced 10 p. 100 1,1,6-trimethyl-1,2-dihydronaphthalene and 90 p. 100 ionene as shown by p.m.r. spectral analysis and g.c.-m.s. analysis.

*Mass spectral analysis.*

A g.c.-m.s. was used to analyse a sample of the compounds in peak 16 (fig. 1). The major compounds was 1,1,6-trimethyl-1,2-dihydronaphthalene with traces of :

*a*) two isomers of ionene,

*b*) an aromatic $C_{15}H_{24}$ with molecular ion 204 and a base peak of 189,

*c*) molecular ion 170, hydrocarbon $C_{21}H_{22}$ reported by Kemp (1971),

*d*) molecular ion 156, possibly 1,6-dimethylnaphthylene.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The author wishes to thank the Millaquin Sugar Company for allowing him to publish the data obtained and Professor M. D. SUTHERLAND for supervising the author's Master's thesis of which the results in this paper are a part. He is also indebted to Dr. K. E. MURRAY of the C.S.I.R.O. for the mass spectra.

## RÉSUMÉ

### ALCOOLS PEU VOLATILS, ESTERS ET HYDROCARBURES DANS UN RHUM BRUT AUSTRALIEN

Une nouvelle source de quantité appréciable de composés volatils du rhum est décrite. L'examen de concentrats ainsi produits a permis l'identification de nombreux composés organiques parmi lesquels : 1-1,-triméthyl-1,2-déhydronaphtalène, heptane-1-ol (—), oct-1-ène-3-ol, méthyl-salicylate et de nombreux esters d'acides gras. Le travail a été fait sur du rhum brut, c'est-à-dire avant vieillissement. Quelques-uns des composés identifiés étaient considérés jusqu'ici comme formés pendant le vieillissement.

## RESUMEN

### ALCOHOLES POCO VOLATILES, ESTERES E HIDROCARBUROS EN UN RON BRUTO AUSTRALIANO

Figura descrita en este artículo una nueva fuente de cantidad apreciable de compuestos volátiles del ron. El examen de concentrados así producidos ha permitido la identificación de un gran número de compuestos orgánicos entre los cuales cabe hacer mención de : 1-1, trimetil-1,2-dehidronaftaleno, heptano-1-1, (—) oct-1 ene-3-ol, metilsalicilato y asimismo, numerosos ésteres de ácidos grasos. El trabajo ha sido efectuado mediante ron bruto, es decir, antes de su añejamiento. Algunos de los compuestos identificados se consideraba que su formación tenía lugar durante el añejamiento.

## RIASSUNTO

### ALCOOL POCO VOLATILI, ESTERI E IDROCARBURI IN UN RUM GREZZO AUSTRALIANO

Lo studio porta su una nuova fonte di una rilevante quantità di composti volatili del rum. L'esame dei concentrati così prodotti ha permesso di identificare numerosi composti organici tra i quali : 1-1, -tri metil-1,2-deidronaftalina, eptano-1-1 (—) oct-1-ene-3-ol ; metil salicilato e numerosi esteri di acidi grassi. Per lo studio à stato impiegato del rum grezzo, cioè prima dell'invecchiamento. Lo studio ha permesso di identificare dei composti che, si credeva si formassero durante l'invecchiamento.

## REFERENCES

Allan D., 1973. A new approach to the identification of flavour compounds in rum. *Aust. Wine Brewing and Spirit Review, Jan.*, 42-44.

Bogert M., Fourmann V., 1933. The catalytic dehydration of ionone and the constitution of ionene. *J. Am. Chem. Soc.*, **55**, 4670.

Bower J., Cooke L., 1943. An efficient low holdup distillation column. *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.*, **15**, 290-293.

Kemp J., Stoltz L., Packett L., 1971. Aromatic Hydrocarbons. Examination of Peach Volatiles and Foliage Volatiles. *Phyto. Chem.*, **10**, 478.

Lecky H., Ewell R., 1942. *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.*, **14**, 503.

Liebich H., Koenig W., Bayer E., 1970. Analysis of flavour of rum by gas liquid chromatography and mass spectrometry. *J. Chromatogr. Sci.*, **8**, 527-533.

Maarse H., ten Noever de Brauw M., 1966. The analysis of volatile components of Jamaican rum. *J. Food Sci.*, **31**, 951-55.

Morton R., 1944. *Nature*, **153**, 405.

Murahashi L., 1937. *Scient. Pap. Inst. Phys. Chem. Res.*, **34**, 159.

Tiemann F., 1893. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.*, **26**, 2675.

Vogel A., 1956. *A textbook of practical organic chemistry*, 245-260.

Wobben H., Timmer R., ten Heider de Valois P., 1971. Nitrogen compounds in rum and whisky. *J. Food Sci.*, **36**, 464.

*Ann. Technol. agric.*, 1975, **24** (3-4), 247-254.

# TENEUR EN ISOTOPES STABLES DU RHUM ET DES PRINCIPAUX ALCOOLS DE BOUCHE

J. BRICOUT et Y. MÉNORET

*I. R. A. B.,*
*120, avenue Foch,*
*94003 Créteil*

## RÉSUMÉ

Au cours de la fermentation, on observe une perte importante de deutérium entre le sucre et l'alcool mais par contre la teneur en $^{13}C$ reste la même. On peut donc établir une relation entre la teneur isotopique du sucre et celle de l'éthanol correspondant.

D'autre part, certains des principaux sucres utilisés industriellement pour les produits fermentés peuvent être caractérisés par leur teneur en deutérium ou $^{13}C$.

En conséquence, dans de nombreux cas, une mesure précise de la teneur isotopique permet d'identifier l'origine végétale d'une boisson alcoolisée ou de déterminer la proportion de chaque alcool dans un mélange.

La teneur en isotopes stables d'une substance organique ou minérale commence à être considérée depuis quelques années comme une caractéristique intéressante permettant de préciser bien souvent son origine géographique ou végétale (Bricout, Fontes, Letolle, Merlivat, 1975). Les isotopes stables, carbone 13, oxygène 18 et deutérium, en particulier, se comportent comme des traceurs naturels, non radioactifs, avec lesquels on peut faire des observations aussi fines qu'avec les traceurs radioactifs mais d'un ordre différent. En effet, le biochimiste qui utilise le carbone 14 pour étudier le métabolisme d'un médicament, d'un pesticide ou d'un additif alimentaire, essaie de suivre dans le temps les étapes successives de la répartition et de la dégradation de cette substance dans l'organisme vivant, en supposant que le comportement de la molécule marquée est identique à celui de la molécule naturelle.

Au contraire, le physiologiste ou l'analyste qui s'intéressent à l'abondance relative du deutérium par rapport à l'hydrogène, ou du carbone 13 par rapport au carbone 12, essaient de tirer parti des différences de comportement de ces atomes vis-à-vis de la cellule animale ou végétale.

## I. — LES PHÉNOMÈNES NATURELS DE SÉGRÉGATION ISOTOPIQUE

Or, les phénomènes de ségrégation isotopique sont relativement nombreux dans la nature et il est intéressant d'en citer quelques-uns, qui interviennent dans l'application de cette technique d'analyse au problème des alcools.

En premier lieu, on sait que les eaux de précipitation atmosphérique sont plus pauvres en deutérium et oxygène 18 que l'eau des océans, et cet appauvrissement est d'autant plus marqué que la température de condensation est plus basse ; les eaux de fonte des neiges sont beaucoup plus pauvres que les eaux de pluie tropicales, et cette observation peut être mise à profit pour caractériser l'origine d'une eau.

Quand l'eau du sol est absorbée par les racines d'une plante, il n'y a pas, semble-t-il, de ségrégation isotopique, mais par contre, dans les feuilles, par suite de l'évaporation de l'eau à travers les stomates, il y a accumulation de deutérium et d'oxygène 18, en raison de la faible volatilité de $HD^{16}O$ et $H_2{}^{18}O$ comparée à celle de $H_2{}^{16}O$.

Globalement, la teneur moyenne en deutérium de l'eau d'un végétal est donc supérieure à celle de l'eau du sol. On pourrait s'attendre à ce qu'il en soit de même pour les substances organiques synthétisées par ce végétal, puisque tous les atomes d'hydrogène proviennent de cette eau. En fait on constate qu'il n'en est rien : la teneur en deutérium de toutes ces substances est variable selon la complexité de leur voie de biosynthèse, mais reste toujours inférieure à celle de l'eau des tissus. Il y a donc à ce niveau une ségrégation d'ordre biochimique.

Un autre phénomène de ségrégation concerne la fixation du $CO_2$ au cours de la photosynthèse : le $^{13}CO_2$ atmosphérique (dont la teneur reste très sensiblement constante dans le temps et l'espace) est en effet fixé en proportion moins importante que le $^{12}CO_2$. Mais le facteur de fractionnement est cette fois caractéristique de l'espèce végétale considérée (Smith, Epstein, 1971) :

*a*) La plupart des espèces végétales (gymnospermes, angiospermes monocotylédones et dicotylédones) assimilent le $^{13}CO_2$ avec une forte déperdition, correspondant à un écart relatif ($\delta^{13}C$) de l'ordre de —23 à —36 p. 1 000 par rapport au standard international dit PDB.

$$\delta^{13}C = \left[\frac{^{13}C/^{12}C\ (\text{échantillon})}{^{13}C/^{12}C\ (\text{étalon})} - 1\right] 1000$$

Étalon deutérium = SMOW (Standard Mean Ocean Water)
Étalon carbone 13 = PDB (Pee Dee Belemnite : calcaire provenant d'une couche géologique définie)
Étalon oxygène 18 = SMOW.

Dans cette catégorie figurent en particulier la Betterave, le Raisin, la Pomme, l'Orge. Toutes ces plantes sont caractérisées par le fait que le $CO_2$ est fixé selon le cycle décrit par Calvin, par combinaison avec le ribulose 1-5 diphosphate.

*b*) Un plus petit nombre de végétaux, comprenant des graminées tropicales (maïs, sorgho et canne à sucre) et des plantes de climat chaud et sec présentent une teneur en $^{13}C$ plus forte. La valeur du $\delta^{13}C$ est comprise entre —5 et —18 p. 1 000.

Ces plantes fixent le $CO_2$ selon le processus décrit par HATCH et SLACK (1966), par combinaison avec le phosphoenol pyruvate. Pour chaque espèce considérée, le rapport $^{13}C/^{12}C$ caractérise l'ensemble des substances organiques de ces tissus et cette valeur n'est que très peu modifiée par l'origine géographique.

Cependant, à proximité d'une région industrielle où se trouve dans l'atmosphère une plus forte concentration en $CO_2$ fossile plus pauvre en $^{13}C$, on remarque une légère régression de la teneur en $^{13}C$.

Ces remarques préliminaires permettent de comprendre que la plupart des substances organiques d'origine végétale peuvent être caractérisées par leur teneur en $^{13}C$ ou en deutérium et que l'eau d'un végétal est en outre caractérisée par sa teneur en $^{18}O$. Le tableau 1 montre qu'il en est ainsi des principaux glucides utilisés industriellement pour la production d'alcool éthylique. Le saccharose de canne à sucre se révèle en particulier nettement plus riche en deutérium et carbone 13 que le saccharose de betterave.

TABLEAU I

*Composition isotopique de glucides de diverses origines*

| | | $\delta^{13}C$ p. 1 000 PDB | $\delta D$ p. 1 000 SMOW |
|---|---|---|---|
| Saccharose | betterave France .... | — 25 | — 68 |
| | canne à sucre Antilles. | — 10,5 | — 7 |
| Glucose | maïs France ........ | — 11,3 | + 11 |
| | orge ............... | — 25 | |
| Glucides | raisin Languedoc .... | — 26 | — 40 |

## II. — PHÉNOMÈNES DE SÉGRÉGATION ISOTOPIQUE SURVENANT AU COURS DE LA FERMENTATION ALCOOLIQUE

Un récent travail de BRICOUT, FONTES et MERLIVAT (1975) nous a permis de confirmer les premières observations de PONTICORVO (1968) sur le fractionnement important en deutérium qui accompagne la fermentation du saccharose ou des sucres du raisin.

Nous avons en effet constaté que l'éthanol issu de la fermentation était nettement plus pauvre en deutérium que le sucre de départ. L'écart relatif des abondances ($\delta D$) passe par exemple de —40 dans le sucre à —229 p. 1 000 dans l'alcool (tabl. 2) ou bien de —68 à —270 p. 1 000 dans une autre expérience faite avec une eau moins riche en deutérium. Au total, il n'y a évidemment pas de perte de deutérium et la fraction de deutérium écartée de l'alcool se retrouve dans l'eau, qui est sensiblement enrichie. Il semble donc bien qu'au cours de la conversion du glucose en alcool les atomes d'hydrogène qui, à partir de l'eau, sont introduits dans la molécule d'éthanol, fassent l'objet d'un fractionnement important. Déjà PONTICORVO (1968) avait indiqué que lors de la conversion du phosphoenol pyruvate en pyruvate, l'hydrogène nécessaire, qui provient de l'eau, était appauvri de 700 p. 1 000 en deutérium.

Par contre, la teneur en carbone 13 de l'alcool reste la même que celle du sucre. Il en résulte que les écarts entre les teneurs en $^{13}C$ des divers sucres doivent se retrouver entre les alcools correspondants.

De même la teneur en oxygène 18 de l'eau demeure sensiblement constante.

TABLEAU 2

*Composition isotopique des constituants principaux d'un jus de raisin et du vin correspondant*

| | δD p. 1 000 SMOW | $\delta^{18}O$ p. 1 000 SMOW | $\delta^{13}C$ p. 1 000 PDB |
|---|---|---|---|
| Jus de raisin | | | |
| sucres | — 40 | | — 26,7 |
| eau | — 7,1 | + 2,2 | |
| Vin | | | |
| alcool | — 229 | | — 27,4 |
| eau | + 29,4 | + 2,9 | |

## III. — CARACTÉRISTIQUES DES ALCOOLS DE BOUCHE

A partir de ces observations initiales sur la fermentation alcoolique du jus de raisin, nous avons essayé de voir s'il était possible de caractériser chaque type d'alcool de bouche par sa teneur en $^{13}C$ et D. Le tableau 3 montre qu'il en est bien ainsi. L'alcool

TABLEAU 3

*Caractéristiques des principaux alcools*
(Bricout, Fontes, Merlivat, 1975)

| | $\delta^{13}C$ p. 1 000 PDB | δD p. 1 000 SMOW |
|---|---|---|
| Betterave | — 28 | — 257 |
| Raisin | — 25 | — 209 |
| Orge | — 25 | |
| Canne à sucre | — 13 | — 199 |
| Maïs | — 11,5 | — 206 |

de betterave est le plus pauvre à la fois en carbone 13 et en deutérium. L'alcool de raisin (vin, eau-de-vie ou alcool à haut degré) est sensiblement plus riche en deutérium et se trouve à égalité avec l'alcool de maïs, dont il diffère cependant par une plus faible teneur en carbone 13. On voit que l'alcool de canne est le plus riche en deutérium

TABLEAU 4

*Teneur en $^{13}C$ de rhums commercialisés en France et en Allemagne fédérale*

| | Alcool en p. 100 volume | $\delta^{13}C$ p. 1 000 PDB |
|---|---|---|
| *Produits commercialisés en France* | | |
| *Rhums colorés* | | |
| N° 1 | 49 | — 11,90 |
| N° 2 | 47 | — 11,48 |
| N° 3 | 40 | — 11,67 |
| N° 4 | 47 | — 10,95 |
| N° 5 | 44 | — 11,63 |
| *Rhums blancs* | | |
| N° 6 | 50 | — 12,35 |
| N° 7 | 45 | — 12,45 |
| N° 8 | 50 | — 11,53 |
| *Rhums légers blancs* | | |
| N° 9 | 40 | — 11,37 |
| N° 10 | 40 | — 11,03 |
| N° 11 | 40 | — 10,76 |
| *Produits commercialisés en Allemagne fédérale* | | |
| *Deutsches Erzeugnis* | | |
| N° 12 | 38 | — 25,09 |
| N° 13 | 42 | — 25,47 |
| N° 14 | 40 | — 22,92 |
| N° 15 | 42 | — 25 |
| *Ausländisches Erzeugnis* | | |
| N° 16 | 40 | — 12,19 |
| N° 17 | 40 | — 11,86 |
| N° 18 | 73 | — 11,61 |
| N° 19 | 42 | — 13,01 |
| N° 20 | 40 | — 12,31 |
| N° 21 | 75 | — 12,42 |
| N° 22 | 40 | — 12,73 |
| N° 23 | 40 | — 11,83 |
| N° 24 | 54 | — 11,82 |
| *Light and dry* | | |
| N° 25 | 40 | — 11,60 |

des quatre alcools analysés. Les différences relevées entre chaque alcool permettent dans la plupart des cas de déterminer leur origine végétale sans que leur origine géographique n'interfère.

Mais on peut au contraire chercher à préciser celle-ci. Pour l'alcool du vin par exemple, nous avons vu que la teneur en deutérium de l'eau du milieu réactionnel avait une incidence faible mais réelle. Quand on mesure la somme des teneurs en deutérium de l'eau et de l'alcool du vin, on retrouve une valeur très voisine de celle du jus de raisin initial et l'on sait que celle-ci peut caractériser sa région de production (BRICOUT, MÉNORET, 1973).

## IV. — ANALYSE ISOTOPIQUE DES RHUMS

Les résultats précédents ont été obtenus d'abord sur des alcools provenant de fermentations expérimentales en laboratoire puis sur quelques échantillons de produits commerciaux et il était souhaitable de les confirmer.

C'est ce que nous avons commencé à faire en examinant les teneurs en $^{13}C$ d'une vingtaine de rhums vendus en France ou en Allemagne fédérale.

De l'examen de nos résultats d'analyse (tabl. 4), les conclusions suivantes peuvent être tirées :

— pour une catégorie de rhums donnée, les teneurs en $^{13}C$ sont bien groupées (écart autour de la moyenne inférieur ou égal à 1 p. 1 000) ;

— toutes les qualités vendues en France et en Allemagne (exception faite des Deutsches Erzeugnis) ont la même teneur en $^{13}C$. Les rhums allégés ne font pas exception. Rhums agricoles et rhums industriels présentent les mêmes valeurs.

Par contre les rhums vendus en Allemagne sous le nom de Deutsches Erzeugnis ont une teneur en $^{13}C$ nettement plus proche de celles des alcools de Betterave ou de Raisin que de celle de la Canne à sucre.

## V. — TECHNIQUES EXPÉRIMENTALES

### 1. — *Détermination du rapport $^{13}C/^{12}C$ dans les alcools*

L'échantillon d'alcool (10 à 15 µl de degré supérieur à 35°GL) est placé dans un porte-échantillon en quartz contenant 500 mg d'oxyde de cobalt et relié à la ligne de préparation. Il est refroidi à —80°C et l'ensemble du montage est raccordé à la pompe à vide. On introduit ensuite une pression de 500 torrs d'oxygène pur et on chauffe le tube porte-échantillon, à 800°C. Les vapeurs passent ensuite sur un lit d'oxyde de cobalt à 600°C puis elles sont piégées dans un serpentin à —180°C. On élimine l'excès d'oxygène sous vide, on coupe, l'arrivée de vide, on réchauffe le serpentin à —80°C. Le $CO_2$ sublime et est condensé dans un ballon porte-échantillon maintenu à —180°C. Ce dernier est ensuite fixé sur le système d'introduction d'un spectromètre de masse isotopique Micromass 602-C (Sté V. G. Micromass, Winsford, U.K.) ayant les spécifications suivantes :

— double système d'introduction permettant la comparaison de la teneur en $^{13}C$ du gaz à analyser par rapport à un gaz étalon ;

— double collecteur permettant la collection simultanée des ions de masse 45 et 44, ainsi qu'un pont diviseur permettant d'apprécier le rapport des intensités de ces deux ions avec une précision meilleure que 0,1 p. 1 000.

Le résultat de l'analyse est exprimé en p. 1 000 de variation du rapport $^{13}C/^{12}C$ de l'échantillon par rapport au témoin

$$\delta^{13}C = \left[\frac{\text{R échantillon}}{\text{R standard}} - 1\right] \times 1000$$

2. — *Détermination du rapport D/H*

On prépare un échantillon d'alcool absolu par distillation azéotropique ou séchage de l'alcool sur hydrure de calcium. On procède à sa combustion dans les mêmes conditions que précédemment. Puis, après avoir recueilli le $CO_2$, on porte le serpentin à une température de +90°C et on recueille l'eau dans un tube porte-échantillon maintenu à —180°C et l'eau est ensuite réduite en hydrogène par passage sur de l'uranium à 800°C.

L'hydrogène est analysé à l'aide du même spectrographe de masse qui possède un tube analyseur spécial pour l'hydrogène avec une source du type « Bridger » minimisant la formation d'ions $H_3$. La contribution des ions $H_3$ à la masse 3 est éliminée électroniquement.

En conclusion, nous pouvons dire qu'il est possible de caractériser l'origine végétale d'un alcool par sa teneur en $^{13}C$ et en deutérium. Cette détermination est indépendante des impuretés qui accompagnent l'alcool éthylique. Dans le cas des rhums d'origine garantie par exemple, elle permet d'établir avec certitude que l'origine de l'éthanol est bien le saccharose de la canne à sucre, qu'il s'agisse d'un rhum léger ou d'un rhum traditionnel. S'il y a mélange d'alcool de canne avec un autre alcool, la teneur en $^{13}C$ ou en deutérium est significativement modifiée.

## SUMMARY


### STABLE ISOTOPE CONTENT OF RHUM AND OF THE MAIN SPIRITS

During yeast fermentation, a significant loss of deuterium is observed between sugar and alcohol but $^{13}C$ content remains unchanged. Thus a relationship between isotopic ratios in sugar and ethyl alcohol obtained can be established.

On the other hand, some of the most important sugars industrially used for fermented products may be characterized by their deuterium or $^{13}C$ content.

So in many cases it is possible, from a precise measurement of isotopic content, to know what is the origin of an alcoholic beverage or to determine the ratio of each sort of alcohol in a blend.


## RESUMEN


### CONTENIDO EN ISOTOPOS ESTABLES DEL RON Y DE LOS PRINCIPALES ALCOHOLES DE CONSUMO

Durante el transcurso de la fermentación, se observa una pérdida importante de deuterio entre el azúcar y el alcohol, pero, por el contrario, su contenido en $^{13}C$ sigue siendo el mismo. Consecutivamente, cabe establecer una relación entre el contenido isotópico del azúcar y entre el del etanol correspondiente.

Por otro lado, algunos de los principales azúcares utilizados industrialmente para los productos fermentados pueden ser caracterizados por su contenido en deuterio ó $^{13}C$.

Como consecuencia, una medición precisa del contenido isotópico permite identificar en muchos casos, el origen vegetal de una bebida alcoholizada o bien, determinar la proporción de cada alcohol en una mezcla.

## RIASSUNTO


### TENORE IN ISOTOPI STABILI DEL RUM E DEI PRINCIPALI ALCOOLI DA BERE

Durante la fermentazione, si osserva una perdita importante di deuterio tra lo zucchero e l'alcool mentre il suo tenore di $^{13}C$ resta identico. Si puo' dunque stabilire una relazione tra il tenore isotopico dello zucchero e quello dell' etanolo corrispondente.

D'altra parte, alcuni dei principali zuccheri impiegati sul piano industriale per i prodotti fermentati possono essere caratterizzati dal loro tenore in deuterio o $^{13}C$.

Pertanto, in numerosi casi, una misura precisa del tenore isotopico permette di identificare l'origine vegetale di una bevanda alcolizzata o di determinare la proporzione di ogni alcool in un miscuglio.


## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES


BRICOUT J., FONTES J.-C., MERLIVAT L., 1975. Isotope ratios as pollutant source and behaviour indicators, 359-372. *International Atomic Energy Agency*, Vienne.

BRICOUT J., FONTES J.-C., MERLIVAT L., 1975. Sur la composition en isotopess tables de l'éthanol. *Rev. Ind. alim. agric.*, **92**, 375-378.

BRICOUT J., MÉNORET Y., 1973. Teneur en isotopes stables du jus de raisin. Signification biologique et conséquences analytiques. *Commission scientifique et technique de la Fédération internationale des Producteurs de Jus de Fruits*, Vienne.

HATCH M. D., SLACK C. R., 1966. Photosynthesis by sugar cane leaves. A new carboxylation reaction and the pathway of sugar formation. *Biochem. J.*, **101**, 103-111.

PONTICORVO L., 1968. Thesis Ph. Columbia University, U. S. A.

SMITH B. N., EPSTEIN S., 1971. $^{13}C/^{12}C$ ratio for higher plant. *Plant Physiol.*, **47**, 380-384.

*Ann. Technol. agric.*, 1975, **24** (3-4), 255-267.

# LA LÉGISLATION DU RHUM ET SA CONSTITUTION ANALYTIQUE

G. CAVAZZA

*S. A. F. Martini and Rossi,*
*19, avenue Michelet,*
*93404 Saint-Ouen*

## RÉSUMÉ

La définition du rhum doit être généralisée pour tous les pays et au moins pour ceux de la C.E.E.

Les principes sur lesquels se basent les différentes législations sont assez semblables : il s'agit d'harmoniser certains points et d'établir des paramètres valables (autres que le minimum d'impureté), pour un contrôle efficace.

Ceux-ci pourraient être les suivants :

1. Origine
2. Composition chimique globale
3. Présence de substances caractéristiques
4. Rapport entre les alcools supérieurs et son emplacement sur une grille *ad hoc*.

On sait que le mot rhum est d'origine anglaise : il était autrefois utilisé pour désigner les alcools de canne vieillis quelques temps dans des fûts de chêne brûlés à l'intérieur, alors que le mot tafia désignait plus particulièrement des produits parfaitement incolores et de distillation récente.

Aujourd'hui, on parle simplement de rhum brun ou de rhum blanc mais, suivant l'origine de la matière alcooligène, on fait une distinction entre le « rhum industriel » provenant de la distillation des moûts fermentés de mélasse de canne et le « rhum agricole » provenant de la distillation du jus de canne à sucre fermenté (KERVEGANT, 1946 ; GUILLAUME, 1939).

Suivant la législation française « la dénomination « rhum » ou « tafia » est réservée à l'eau-de-vie provenant exclusivement de la fermentation alcoolique et de la distillation soit des mélasses ou sirops provenant de la fabrication du sucre de canne, soit du jus de canne à sucre, non privée par défécation des principes aromatiques auxquels

les rhums et tafias doivent leur caractère spécifique » (décret du 19-8-1921, article 6, alinéa 8).

La législation anglaise précise également que le rhum est : « a spirit distilled direct from sugar-cane products, in sugar cane growing countries ».

La législation se base donc sur deux points précis : la définition de la source alcooligène (canne à sucre) et l'origine du lieu de production ; la législation française fait en plus un rappel au caractère spécifique de la boisson, alors que les anglais passent sous silence ce point.

Enfin, point non négligeable, les normes d'application françaises indiquent que la distillation doit être effectuée en une seule fois et que le degré de distillation ne doit pas être supérieur à 75° (rhums du contingent).

Il est logique de penser qu'à un type de produit bien défini, correspond une composition chimique donnée.

Or, la variété d'alcools produits à partir de sources alcooligènes naturelles est très grande, mais les différences analytiques qui permettent d'en reconnaître facilement les fraudes ne sont pas aussi évidentes. Nous allons essayer de voir comment la définition du rhum pourrait être complétée par une définition des constituants chimiques, comme cela est fait pour d'autres produits.

En effet, pour les experts qui se trouvent devoir juger fréquemment des échantillons de rhum, il est indispensable que les caractéristiques chimiques du rhum soient bien fixées, afin qu'il n'y ait pas de doute possible. Or, cela ne peut être réalisé que par une connaissance précise des principes aromatiques auxquels les rhums et tafias doivent leur caractéristique spécifique.

Examinons rapidement les législations actuelles dans les pays d'Europe, telles qu'elles sont regroupées schématiquement sur le tableau 1.

On constate immédiatement que le critère de la définition du rhum est basé sur la détermination des limites minimales ou maximales des constituants autres que l'alcool éthylique, calculés globalement ; dans certains cas seulement, quelques spécifications particulières sont exigées ; cependant ces limites sont tout à fait insuffisantes pour définir réellement les caractéristiques du produit ; un alcool synthétique avec 280 g/hl AP d'impuretés serait parfaitement acceptable sur le plan strictement analytique.

Un premier pas vers une solution plus scientifique et rationnelle a été proposé par les récentes dispositions du Monopole de la République fédérale d'Allemagne, qui requiert la présence d'au moins quatre éléments autres que l'alcool éthylique, choisis parmi les constituants habituels du rhum. Par contre, dans les autres pays, à part un coefficient minimum de non-alcool, il n'y a pas d'exigences précises.

Nous savons que les limites fixées pour le minimum d'impuretés ont été décidées pour garantir le rhum contre tout mélange avec un alcool neutre. Dans certains pays cependant, cette même pratique est encore admise aujourd'hui. Or, on ne peut pas, dans les pays de la Communauté Européenne, appeler rhum des produits différents, seulement parce qu'ils sont consommés d'un côté ou de l'autre d'une frontière.

La pratique de l'utilisation d'un coefficient minimum de non-alcool est basée sur le fait que les méthodes analytiques ne permettaient, avant l'emploi de la chromatographie en phase gazeuse (CPG), de distinguer un produit alcoolique d'un autre que par le dosage de certaines fonctions chimiques (esters, aldéhydes, alcools, acides) (MAUREL et LAFARGE, 1963) ; MAUREL, 1964). Les dosages étaient d'ailleurs effectués

TABLEAU I

*Limites de composition des rhums admises dans divers pays*

Coefficient non-alcool

| | Rhum blanc | Rhum brun | Observations |
| --- | --- | --- | --- |
| Allemagne | > 224 g/hl : rhum, fiscalité réduite<br>< 224 > 60 : rhum léger fiscalité pleine<br>< 60 n'est pas considéré rhum. | > 224 g/hl | Pas de méthanol.<br>Au moins 4 éléments autres que l'éthanol, l'acétaldéhyde, parmi : l'acétate d'éthyle, le propanol, l'isobutanol, le pentanol et leurs esters. |
| Belgique | — | — | Pas de législation particulière, sauf celle concernant les étiquettes. |
| France | Règlement officiel<br>Minimum : 280 g/hl AP<br>Nouvelle circulaire<br>224 g/hl. AP | Règlement officiel<br>Minimum : 280 g/hl AP<br>Nouvelle circulaire<br>24 g/hl AP | Rhum vieux : > 325 g/hl AP.<br>Rhum hors contingent à l'exportation > 60 g/hl AP |
| Hollande | — | — | Pas de législation particulière, degré minim. 35° GL |
| Italie | Minimum : 90 g/hl AP<br>Maximum : 1 250 g/hl AP | Minimum : 150 g/hl AP<br>Maximum : 1 250 g/hl AP | Alcool méthylique < 0,05 mg/100 ml<br>Alcools supérieurs < 500 mg/100 ml d'alcool anhydre. |
| Angleterre | — | — | Def : alcool distillé directement des produits de la canne à sucre sur les lieux de production.<br>Au moins 3 ans d'âge. |

TABLEAU I *bis*

*Composition chimique des rhums*

| Rhum blanc agricole | | Rhum brun | |
| --- | --- | --- | --- |
| Alcool 45°-47° | g/hl AP | Alcool 40°-45° | g/hl AP |
| Acides | 16/ 45 | Acides | 25/ 40 |
| Esters | 30/ 65 | Esters | 55/125 |
| Aldéhydes | 8/ 20 | Aldéhydes | 4/ 15 |
| Alcools supérieurs | 170/320 | Alcools supérieurs | 140/200 |
| Impuretés | 224/450 | Impuretés | 224/380 |

globalement et exprimés comme le produit contenu dans la proportion la plus élevée.

Actuellement, les techniques d'analyse instrumentale ont tellement évolué qu'il est aisé de déterminer la présence de certains constituants spécifiques des alcools en général et du rhum en particulier, d'une manière catégorique (STEVENS et MARTIN, 1965).

De nombreux chercheurs ont d'ailleurs attiré l'attention du législateur et des analystes sur l'insuffisance des méthodes officielles (MATARESE et NAVARRA, 1969) ; TARANTOLA, 1971). Tout récemment, l'arrêté du 31 juillet 1973 a admis en France l'utilisation de la CPG pour l'analyse des alcools supérieurs, à côté ou en remplacement de la méthode Rocques.

L'examen de plusieurs centaines d'échantillons de rhums d'origine sûre nous amène à indiquer une fourchette pour les caractéristiques analytiques pour les deux catégories de rhums commercialisés en France : rhum blanc et rhum brun (tabl. 1). Mais cela est encore insuffisant sur le plan analytique, lorsqu'on veut déterminer l'origine d'un rhum.

L'examen organoleptique est certainement la base fondamentale de la détermination qualitative et de l'origine du rhum, au point que les services des Fraudes, pour les cas douteux, font appel aux experts qui ne sont pas embarrassés pour classer un rhum suivant son origine, par une dégustation attentive.

Il faudrait donc modifier la détermination de la pureté du rhum par le coefficient non-alcool, en prenant en considération les 4 points suivants :

| | |
|---|---|
| 1. Origine | Examen organoleptique |
| 2. Composition chimique globale | Analyse classique : équilibre de la constitution |
| 3. Présence de substances caractéristiques | Analyse CPG de certains constituants tels qu'esters, alcools supérieurs |
| 4. Rapport entre les alcools supérieurs | Le classement statistique des rapports des alcools supérieurs peut donner l'indication de l'origine et du type du rhum, et sa différenciation des autres alcools. |

Nous allons examiner dans les détails ces quatre points.

## I. — ORIGINE

Elle peut être déterminée par la définition du rhum : « eau-de-vie provenant exclusivement de la fermentation alcoolique et de la distillation, soit des mélasses ou sirops provenant de la fabrication du sucre de canne, soit du jus de canne à sucre distillé sur place », et être complétée par un examen organoleptique.

La dégustation est effectuée après dilution avec de l'eau, pour avoir un degré compris entre 25 et 30°.

## 2. — COMPOSITION CHIMIQUE MOYENNE

La composition chimique des rhums, au stade de la commercialisation, est obtenue par l'analyse classique (dosage des fonctions) et donne des résultats compris dans les fourchettes indiquées dans le tableau 2.

TABLEAU 2

*Analyse d'un rhum agricole*

*Analyse chimique.*

| | |
|---|---|
| Masse volumique | 0,90795 |
| Degré d'enfoncement | 62,50° |
| Degré réel | |
| pH | 4,75 |
| Densité optique (410 nm) | 0,105 |
| Acidité (en g/hl AP) | 30,7 |
| Esters (en g/hl AP) | 46,3 |
| Acétate d'éthyle | 15,9 |
| Aldéhydes | |
| Alcools supérieurs | 281,9 g/hl AP |
| Alcool propylique | 37,6 |
| Alcool isobutylique | 57,7 |
| Alcool *n*-butylique | |
| Alcool amylique actif | 21,4 |
| Alcool isoamylique | 165,2 |
| Coefficient non alcool | |

*Analyse organoleptique.*

Teinte : paille très claire
Aspect : limpide
Bouquet : riche, fin, éthère avec caractère
Goût : rond, souple, net, avec caractère

Référence Codedge

Chromatogramme N° R 549

*Observations*

PRÉSENTE LE CARACTÈRE D'UN RHUM

## 3. — PRÉSENCE DE SUBSTANCES CARACTÉRISTIQUES

En complément de cette constitution moyenne, le rhum peut révéler, à l'analyse en CPG, la présence des composés suivants (LIEBICH, 1970).

*Alcools*

Méthanol
Éthanol
*n*-propanol
Isobutanol
Méthyl-2-butanol-1 (pentanol actif)
Méthyl-2-butanol-1 (pentanol actif)
Méthyl-3-butanol-1 (*iso*-pentanol)
2-butanol } dans certains cas, notamment rhums de la Jamaïque
*n*-butanol }
Hexanol
*B*-phényléthanol

*Esters* (à part l'acétate d'éthyle)

Formiate d'éthyle
Propionate d'éthyle
Butyrate d'éthyle
Valérate d'éthyle
Caproate d'éthyle
Caprylate d'éthyle
Caprate d'éthyle
Laurate d'éthyle
Myristate d'éthyle
Palmitate d'éthyle
Stéarate d'éthyle
Linolate d'éthyle
Lactate d'éthyle

*Acides*

Acétique
Propionique
Butyrique
Valérique
Caproïque
Caprylique
Laurique
Myristique
Palmitique
Stéarique

*Composés carbonylés*

Acétaldéhyde }
Propionaldéhyde }
Isovaléraldéhyde } sont présents en très faibles quantités
2-méthyl butyraldéhyde }
Isobutyraldéhyde }
Furfural

*Acétals*

1-1-diéthoxyéthane
1-éthoxy-1-(3-méthyl butoxy) éthane
1-éthoxy-1-(2-méthyl butoxy) éthane
1-(2-méthyl propoxy)-1-(3-méthyl butoxy) éthane
1,1-di (3-méthyl butoxy)-éthane
1,1-diéthoxy-3-méthyl butane
et toutes les autres combinaisons possibles.

*Autres composés également présents*

Phénols dont :
Gaïacol
Éthyl-4-phénol
Éthyl-4-gaïacol
Vinyl-4-gaïacol
Propyl gaïacol

Alkyls pyrazines dont :
Méthyl pyrazine
Diméthyl pyrazine
Méthyl éthyl pyrazine
Diméthyl éthyl pyrazine

## 4. — RAPPORTS ENTRE LES ALCOOLS SUPÉRIEURS

On peut obtenir des renseignements intéressants par les deux méthodes suivantes :

a) *Classement statistique.*

En portant sur une grille les pourcentages des trois principaux alcools supérieurs, les échantillons tombent dans une rose assez étroite (fig. 1).

b) Par le calcul du rapport méthyl-2-butanol-1, on trouve que sur méthyl-3-butanol-1 les rhums ont des valeurs comprises entre 10 et 20. Bien que cette valeur soit assez large, elle est cependant bien détachée des autres eaux-de-vie naturelles, telles que cognac et whisky qui se trouvent dans une zone plus restreinte autour de 22 et 38 respectivement (fig. 2).

Rappelons que la séparation des deux pentanols est réalisée aisément par l'emploi d'une colonne 2 p. 100 glycérol + 2 p. 100 1.2.6. hexanetriol.

*Cas particuliers.*

A côté du rhum agricole (tabl. 2) et du rhum brun, il y a deux types de rhums dont la commercialisation est courante bien que limitée pour le moment. Il s'agit de :

1° *Grand Fond Galion :* c'est un rhum issu d'une fermentation très particulière dans laquelle différentes souches de bactéries interviennent dans une proportion aussi importante que les levures alcooligènes classiques.

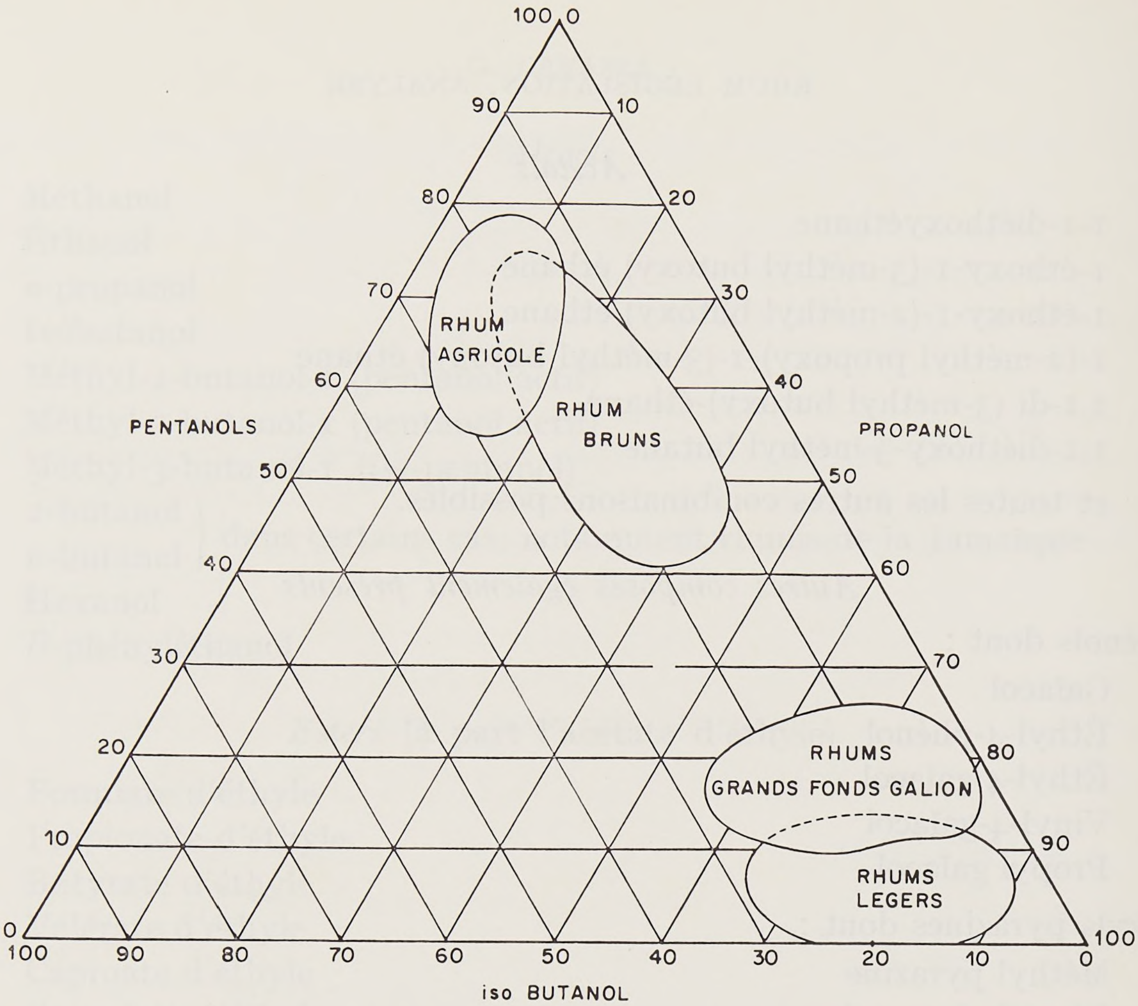



Fig. 1. — *Pourcentage des alcools supérieurs dans les divers types de rhum*

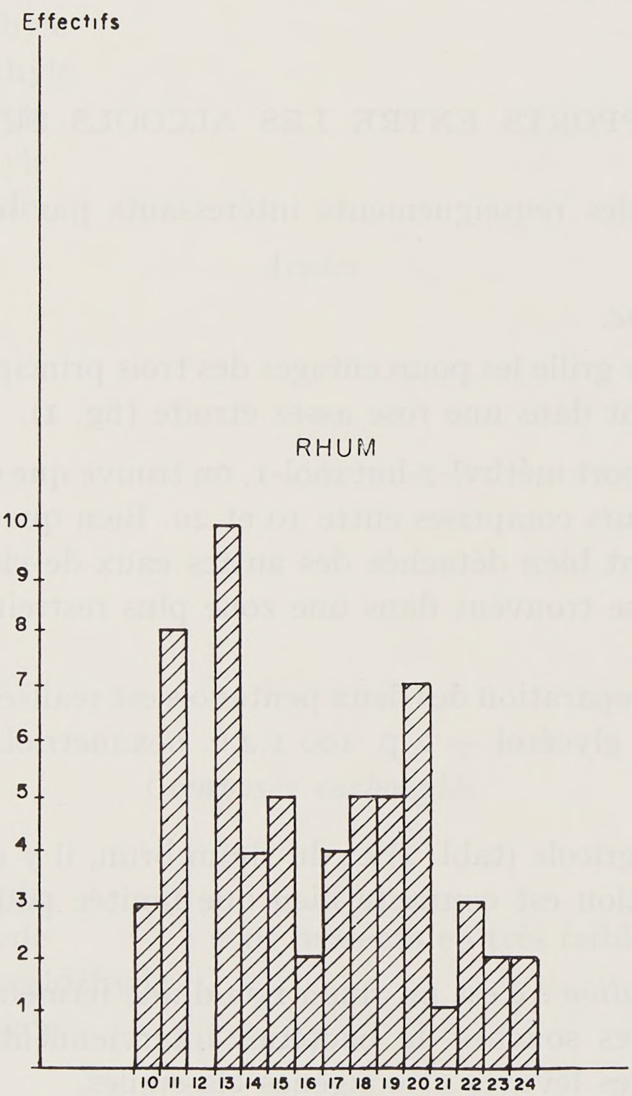



Fig. 2. — *Répartition des rhums en fonction de leur teneur en* $\frac{\textit{Méthyl-2-butanol-1}}{\textit{Méthyl-3-butanol-1}}$

De ce fait, on trouve dans ce rhum beaucoup de produits très volatils tels qu'esters et aldéhydes et relativement peu d'alcools supérieurs.

Il paraît assez difficile d'enfermer dans un schéma analytique pareil produit, dont nous donnons (tabl. 3) une analyse type.

TABLEAU 3

*Analyse d'un rhum grand arôme*

*Analyse chimique.*

| | |
|---|---|
| Masse volumique | 0,91784 |
| Degré d'enfoncement | 58,00° |
| Degré réel | |
| pH | 4,60 |
| Densité optique | 0,810 |
| Acidité (en g/hl AP) | 43,0 |
| Esters (en g/hl AP) | 728,0 |
| Acétate d'éthyle | 536,0 |
| Aldéhydes | |
| Alcools supérieurs | 217,0 |
| Alcool propylique | 206,0 |
| Alcool isobutylique | 5,0 |
| Alcool *n*-butylique | |
| Alcool amylique actif | Traces |
| Alcool isoamylique | 6 |
| Coefficient non alcool | |

*Analyse organoleptique.*

Teinte : brun, foncé
Aspect : limpide
Bouquet : riche, élevé, très éthère, caractère
Goût : franc, riche, souple avec caractère

Référence Codedge

Chromatogramme N° R 552

*Observations*

PRÉSENTE LE CARACTÈRE D'UN RHUM

2° L'autre type de rhum est le rhum léger ou « Light Rhum » qui trouve un gros succès auprès des consommateurs anglo-saxons à cause de sa légèreté et de son aptitude à être employé en mélange avec des jus de fruits et sirops, pour la préparation de cocktails de fruits.

Suivant la législation anglaise, du moment que les deux points sus-mentionnés sont respectés, il n'y a pas de fraude, même si le rhum est distillé en plusieurs phases et en partie rectifié.

La législation française admet aujourd'hui qu'un rhum léger peut être produit par les pays d'Outre-Mer, mais à la condition qu'il soit distillé à un degré non supérieur à 95° et par distillation directe sans aucune rectification, ni immédiate, ni ultérieure. Le produit appelé « rhum léger » doit avoir un minimum d'impuretés de 90 g/hl AP et présenter les caractères organoleptiques de la canne à sucre.

Nous donnons dans le tableau 4 une analyse type d'un rhum léger « Réunion ».

On constate tout de suite qu'un tel rhum contient une proportion élevée d'alcool propylique par rapport au butanol et à l'isopentanol. Son emplacement sur la grille

statistique des rapports entre les alcools ne correspond ni au cas du rhum brun, ni à celui du rhum agricole, mais se trouve dans un secteur bien à part. Il se situe également dans une position très différente des light-rhums d'importation étrangère, qui sont préparés par reconstitution des fractions distillées et/ou rectifiées.

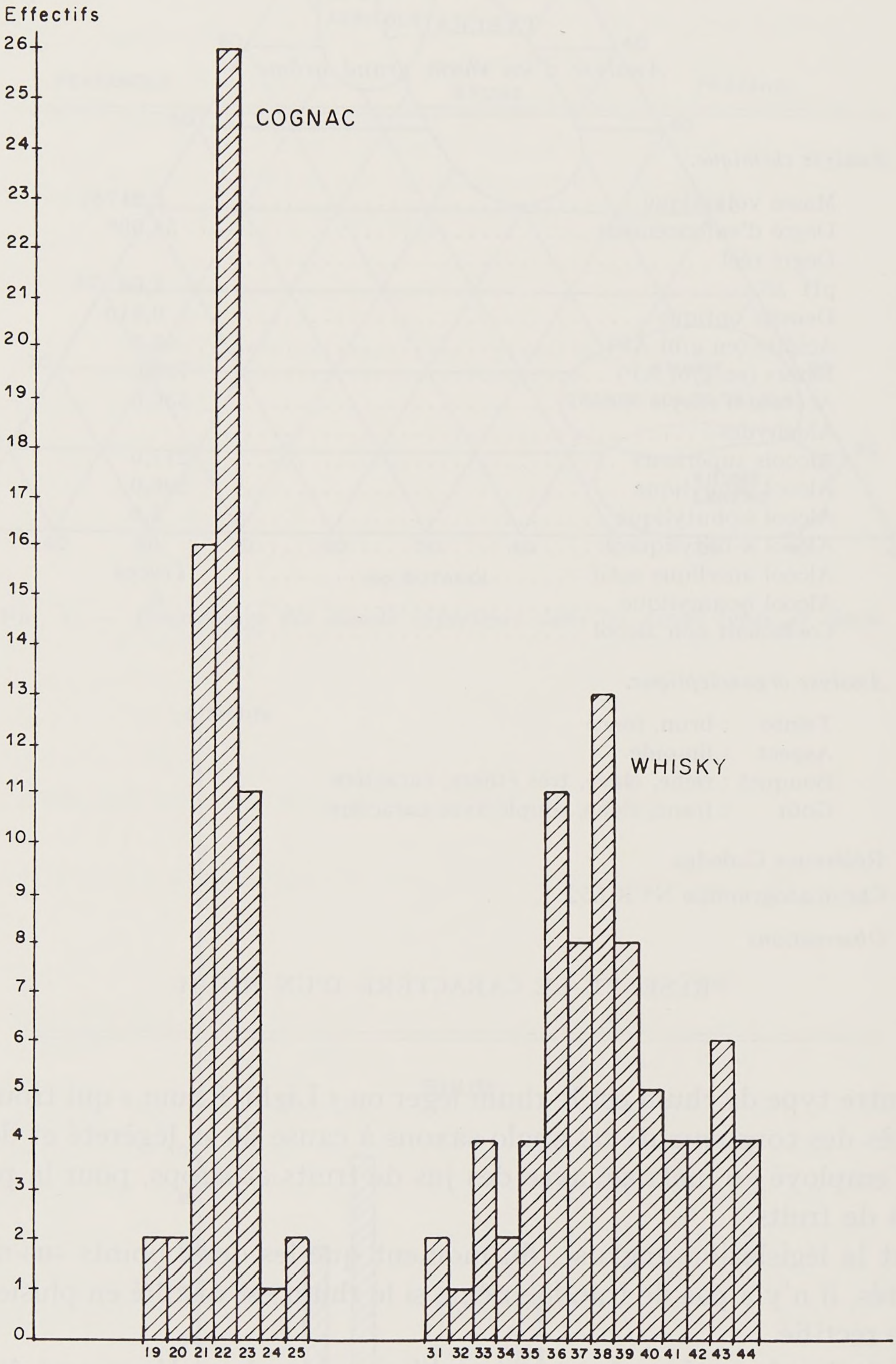



FIG. 3. — *Répartition des Cognacs et Whiskies en fonction de leur teneur en* $\frac{\textit{Méthyl-2-butanol-1}}{\textit{Méthyl-3-butanol-1}}$

Sur le plan analytique, compte tenu de la teneur en propanol élevée et de la faible teneur en butanol et isopentanol, il serait absolument erroné de calculer son coefficient d'impuretés par la méthode Rocques. Seule l'analyse en CPG peut donner des résultats précis et clairs. Il nous semble donc nécessaire d'indiquer que l'analyse d'un rhum léger doit être impérativement effectuée par CPG.

TABLEAU 4

*Analyse d'un rhum léger*

*Analyse chimique.*

| | |
|---|---|
| Masse volumique | 0,94754 |
| Degré d'enfoncement | 40,30° |
| Degré réel | 40,5° |
| pH | 6,35 |
| Densité optique | incolore |
| Acidité (en g/hl AP) | 8,93 |
| Esters (en g/hl AP) | 25,34 |
| Acétate d'éthyle | |
| Aldéhydes | |
| Alcools supérieurs | 75,53 g/hl AP |
| Alcool propylique | 62,53 |
| Alcool isobutylique | 6,60 |
| Alcool *n*-butylique | |
| Alcool amylique actif | traces |
| Alcool isoamylique | 6,40 |
| Coefficient non alcool | 109,8 |

*Analyse organoleptique.*

Teinte : incolore
Aspect : limpide
Bouquet : fin, élevé, caractéristique
Goût : fin, souple, franc, avec caractère

Référence Codedge
Chromatogramme N° R 269
*Observations*

PRÉSENTE LE CARACTÈRE ORGANOLEPTIQUE D'UN RHUM

## CONCLUSION

L'emploi de la CPG est par conséquent indispensable pour bien analyser les différents alcools et les rhums en particulier.

Il faut reconnaître le mérite aux récentes dispositions de la Répression des Fraudes d'avoir finalement apporté une solution au problème analytique du rhum. Cette disposition est en effet un premier pas qui, complété par les remarques exposées plus haut, devrait apporter une solution aux trois points suivants :

1° L'exigence du consommateur qui désire des produits plus fins et plus souples, voire même, comme c'est le cas du rhum blanc léger, assez neutres pour être utilisés en long drink ou en cocktail. Ce facteur est déterminant sur le plan commercial et par là même de la production.

2° La définition d'une composition moyenne qui soit équilibrée et évite tout excès, y compris la présence abusive d'alcools supérieurs nuisibles à la santé.

3° La détermination de la présence effective des principaux principes aromatiques auxquels le rhum doit son caractère spécifique.

## SUMMARY

### LEGISLATION AND ANALYTICAL COMPOSITION OF RUM

The definition of rum must be generalized to all the countries and at least to those belonging to the Common Market.

The principles on which the different legislations are based are quite similar : it is only a question of harmonizing some points and of defining the parameters (besides the minimum of impurities) interesting for an adequate control.

These could be the following ones :

1. Origin,
2. Global chemical composition,
3. Presence of typical substances,
4. Relation between the higher alcohols and its place on a special grid.



## RESUMEN

### LA LEGISLACION DEL RON Y SU COMPOSICION ANALITICA

La definición del ron debe ser generalizada para todos los países y, por lo menos, para los países de la Comunidad Económica Europea.

Los principios en que se fundan las distintas legislaciones son bastante semejantes : se trata de poner en armonía ciertos puntos y establecer los parámetros valederos (distintos del factor de impureza mínima), para obtención de un control eficaz.

Dichos principios pueden ser los siguientes :

1. Origen,
2. Composición química global,
3. Presencia de sustancias características,
4. Relación entre los alcoholes superiores y su emplazamiento en una retícula *ad hoc*.



## RIASSUNTO

### LA LEGISLAZIONE DEL RUM E LA SUA COSTITUZIONE ANALITICA

La definizione del rum deve essere generalizzata per tutti i paesi e, almeno, per quelli della C.E.E.

I principi a cui si rifanno le diverse legislazioni sono quasi dappertutto identici : si tratta di armonizzare alcuni punti e di stabilire dei parametri validi (diversi dal parametro del minimo d'impurità) per un controllo efficace.

Questi parametri potrebbero essere i seguenti :

1. Origine,
2. Composizione chimica globale,
3. Presenza di sostanze caratteristiche,
4. Rapporto tra gli alcooli superiori e posizione su una tabella *ad hoc*.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES


GUILLAUME J., 1939. *Le rhum, sa fabrication et sa chimie.* L. Depollier et Cie, Annecy.

KERVEGANT D., 1946. *Rhums et eaux-de-vie de canne.* Les Éditions du Golf, Vannes.

LIEBICH H. M., KOENIG W. A., BAYER E., 1970. Analysis of the flavor of rum by gas liquid chromatography and mass spectrometry. *J. Chromat. Sci.*, **8** (9), 527-533.

MATARESE L., NAVARRA G., 1969. Le caratteristiche chimiche delle grappe venete. Nota I. Coefficienti d'impurezza. *Riv. Vitic. Enol.*, **7**, 255-286.

MAUREL A. J., LAFARGE J. P., 1963. Étude des eaux-de-vie par chromatographie en phase gazeuse. *C. R. Acad. Agr. France*, **49**, 332-339.

STEVENS R. K., MARTIN G. E., 1965. Gas chromatographic identification of ethyl esters of fatty acids in domestic and imported rums. *J. AOAC*, **4**, 802-805.

TARANTOLA C., 1971. La composizione della grappa in relazione all'evoluzione dai costituenti volatili delle vinace durante l'insilamento e alla tecnica della distillazione. *Vini d'Italia*, **73**, 331-335.

*Ann. Technol. agric.*, 1975, **24** (3-4), 269-286.

# PLACE DES RHUMS AU SEIN DES EAUX-DE-VIE

P. de SMEDT et P. LIDDLE

*Centre de Recherches de la S. A. F. Martini et Rossi,*
*19, avenue Michelet,*
*93404 Saint-Ouen*

## RÉSUMÉ

Le but de cette étude est de différencier les eaux-de-vie soit par la présence de certains composés caractéristiques, soit par le rapport de certains constituants.

L'utilisation d'une colonne remplie à 2 p. 100 de glycérol et à 2 p. 100 d'hexanetriol-1,2,6 sur Chromosorb R 100-120 mesh permet la séparation des deux isomères méthyl-2 butanol-1 et méthyl-3 butanol-1. L'étude du rapport de ces deux isomères a été effectuée sur des rhums, des Cognacs, des whiskies, des Armagnacs, des brandies et des Calvados.

La technique d'extraction liquide-liquide dans un appareil de type Mascré, avec le chlorure de méthylène comme solvant, permet une extraction semi-quantitative des esters, du furfural et de l'alcool béta-phényléthylique.

La chromatographie en phase gazeuse de ces extraits permet de mettre en évidence certaines caractéristiques spécifiques des eaux-de-vie suivantes : rhums, Cognacs, Armagnacs, Calvados, whiskies et bourbons. Cette méthode se caractérise par sa reproductibilité et sa grande rapidité, la durée de l'analyse étant ramenée à celle de la chromatographie.

Le couplage chromatographie en phase gazeuse-spectrométrie de masse permet d'identifier, dans certains rhums, des composés particuliers, tels que les triméthyltétrahydronaphtalènes (TTN), les triméthyldihydronaphtalènes (TDN), la damascénone etc.

## INTRODUCTION

L'analyse officielle d'une eau-de-vie avec dosage global des différentes fonctions chimiques donne peu de renseignements sur le type et la qualité de celles-ci. D'autre part, si la dégustation permet de définir le type d'un produit et d'affirmer que celui-ci est bon ou mauvais, elle ne permet pas d'en identifier les causes.

Il a donc paru intéressant d'essayer de définir des critères permettant de mieux caractériser les divers types d'eaux-de-vie, notamment les rhums.

En ce qui concerne le rhum, une étude plus détaillée de ses composants olfactivement importants a été faite, pour essayer de trouver certains caractères spécifiques des différents types de cette eau-de-vie.

Il est évident que les résultats de cette étude ne pourront être significatifs que si les analyses ont été faites sur un nombre suffisamment important d'échantillons.

## I. — ÉTUDE DES ALCOOLS SUPÉRIEURS

### 1. — *Choix de la technique*

Le calcul du taux d'impuretés d'une eau-de-vie faisant intervenir la quantité d'alcools supérieurs qu'elle contient, il importe de pouvoir déterminer cette dernière avec une bonne précision. Il faut d'ailleurs remarquer que les alcools supérieurs constituent bien souvent la part la plus importante des impuretés.

Depuis quelques années, l'analyse par chromatographie en phase gazeuse s'est imposée comme étant la méthode la mieux adaptée au dosage des alcools supérieurs. Cependant, parmi toutes les méthodes proposées, il est parfois difficile de faire un choix.

Il faut citer pour mémoire la technique de BARAUD (1961) qui utilisait comme étalon interne l'alcool éthylique. Cette méthode était assez peu précise en raison des quantités trop importantes d'éthanol provoquant une saturation au niveau du détecteur.

La méthode de BOUTHILET et LOWREY (1959) par étalonnage extérieur est également à rejeter car elle exige une parfaite reproductibilité de l'injection et des conditions analytiques, ce qui est difficile à obtenir.

Les méthodes utilisées par WEBB (1961), FLANZY-JOURET (1963), et BOIDRON (1966) sont assez peu pratiques car elles nécessitent une extraction préalable des alcools supérieurs.

BRUNELLE (1967), utilise un étalonnage interne, ce qui améliore nettement la valeur des résultats obtenus. Cependant, l'étalon choisi, le *n*-butanol, existe parfois en quantité délectable dans certaines eaux-de-vie. L'utilisation du *n*-pentanol comme étalon interne par SINGER (1966) a permis d'éviter cet inconvénient, ce composé n'ayant jamais été signalé dans les eaux-de-vie.

En dehors du problème posé par l'étalonnage, se pose celui du choix de la colonne et des conditions chromatographiques. En ce qui concerne le choix de la colonne, une grande quantité de supports et de phases stationnaires ont été proposés :

- Carbowax 1500 sur chrom W, SCHOENEMAN, DYER (1968), (1973), BRUNELLE (1968), JOURET et MOUTOUNET (1968).
- Carbowax 20-M, GUYMON (1970).
- Carbowax 1540, méthode officielle française (1973).

Ces colonnes présentent toutes l'inconvénient de ne pas séparer le méthyl-2 butanol-1 (pentanol actif) du méthyl-3 butanol-1 (isopentanol).

Parmi les phases stationnaires permettant de séparer plus ou moins bien les 2 pentanols isomères, nous pouvons citer :

- glycérol, VAN DER KLOOT, TENNEY, BAUISSOTTO (1958) ;
- Tide, PORCARO, JOHNSON (1961) ;
- triéthanolamine, SIHTO, NYKANEN, SUOMA LAINEN (1964) ;
- diéthyl tartrate, SINGER, STILES (1965), SINGER (1966) ;

qui donnent une séparation incomplète.

Une séparation complète entre les deux isomères a été obtenue par SINGER (1965) (1966), avec une colonne polyéthylène glycol 200, et par KAHN et BLESSINGER (1972), avec une colonne 2 p. 100 glycérol, 2 p. 100 hexanetriol 1,2,6.

En définitive, notre choix s'est porté sur la méthode proposée par KAHN et BLESSINGER et recommandée par l'A.O.A.C., car elle est rapide (18 mn) et donne une très bonne séparation entre le méthyl-2 butanol-1 et le méthyl-3 butanol-1, composés importants pour la caractérisation de certaines eaux-de-vie. L'utilisation du pentanol-3 comme étalon interne permet, si le cas se présente, de doser le *n*-butanol. L'acétate d'éthyle peut également être dosé avec cette colonne. Il faut signaler cependant que cette colonne sépare assez mal le propanol du butanol secondaire.

*Description de la colonne utilisée :*

Colonne 2 p. 100 glycérol + 2 p. 100 hexanetriol 1,2,6 sur gas chrom R (100-120 mesh, non lavé à l'acide) — 10 pieds ∅ 1/8.

Température d'utilisation : isotherme à 80°C.

Débit d'azote : 24 ml/mn.

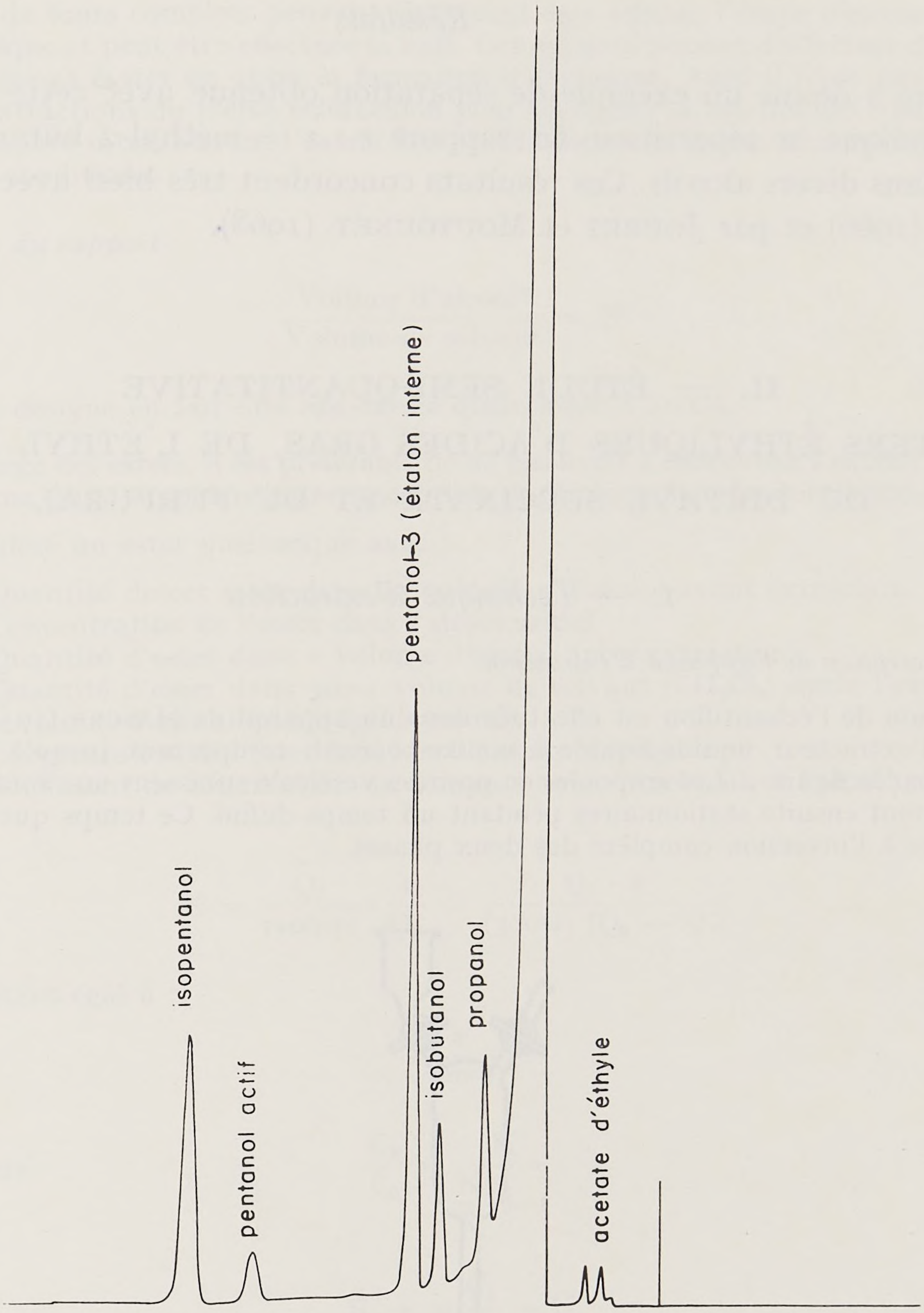



FIG. I. — *Chromatogramme des alcools supérieurs d'un rhum*

TABLEAU I

*Variation du rapport r = méthyl-2 butanol-1/methyl-3 butanol-1 dans diverses eaux-de-vie*

| Eaux-de-vie | Nombre échantillons | Moyenne du rapport *r* (%) | Dispersion (écart-type) (%) |
|---|---|---|---|
| Rhums | 50 | 19,5 | 7,0 |
| Whiskies | 50 | 35,5 | 4,5 |
| Cognacs | 50 | 22,0 | 1,5 |
| Armagnacs | 6 | 24,0 | non calculé |
| Eaux-de-vie de vin | 22 | 24,0 | 6,5 |
| Calvados | 14 | 18,0 | 4,0 |

### 2. — *Résultats*

La figure 1 donne un exemple de séparation obtenue avec cette technique. Le tableau 1 indique la répartition du rapport $r$ ; $r$ = méthyl-2 butanol-1/méthyl-3 butanol-1, dans divers alcools. Ces résultats concordent très bien avec ceux trouvés par SINGER (1966) et par JOURET et MOUTOUNET (1968).

## II. — ÉTUDE SEMI-QUANTITATIVE DES ESTERS ÉTHYLIQUES D'ACIDES GRAS, DE L'ÉTHYL LACTATE, DU DIÉTHYL SUCCINATE ET DU FURFURAL

### 1. — *Technique d'extraction*

1. 1. *Description de l'appareil d'extraction.*

L'extraction de l'échantillon est effectuée dans un appareil de MASCRE (1957). Cet appareil est un type d'extracteur liquide-liquide à contre-courant, comportant jusqu'à 6 ampoules du type indiqué par la figure 2. Les ampoules en position verticale subissent une rotation assez lente de 180° et restent ensuite stationnaires pendant un temps défini. Ce temps que l'on affiche est celui nécessaire à l'inversion complète des deux phases.

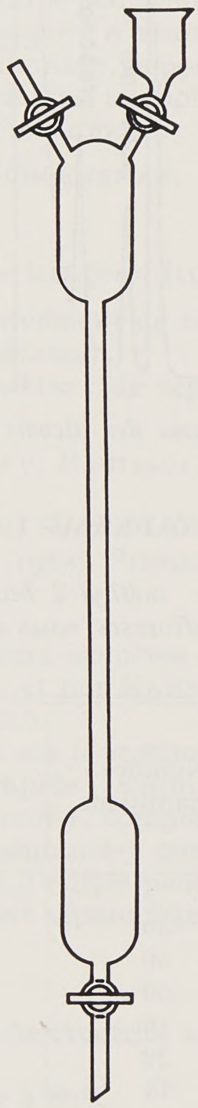


FIG. 2. — *Ampoule d'extraction de* MASCRE

Le nombre de tours complets pouvant également être affiché, l'étape d'extraction est ainsi rendue automatique et peut être effectuée la nuit. Cet appareil permet d'effectuer des extractions très reproductibles et éviter en outre la formation d'émulsions. Ainsi il n'est pas nécessaire de faire plusieurs extractions du même échantillon pour récupérer la totalité des composés, il suffit d'ajouter un standard interne avant l'extraction et d'étalonner la méthode en travaillant toujours dans les mêmes conditions.

1. 2. *Choix du rapport :*

$$\frac{\text{Volume d'alcool*}}{\text{Volume de solvant}} = R$$

Le terme alcool désigne en fait une eau-de-vie quelconque à 40°GL.

Pour le dosage des esters, il est préférable de ne pas avoir à concentrer l'extrait, de façon à ne pas introduire une étape supplémentaire susceptible de diminuer la reproductibilité de la méthode.

Si on considère un ester quelconque avec :

- $Q_0$ : Quantité de cet ester dans un volume $x$ d'alcool avant extraction.
- $C_0$ : Concentration de l'ester dans l'alcool initial.
- $Q_a$ : Quantité d'ester dans $x$ volume d'alcool après extraction.
- $Q_s$ : Quantité d'ester dans 300-$x$ volume de solvant ($CH_2Cl_2$) après l'extraction (avec le volume d'une ampoule égal à 300 ml).
- $C_s$ : Concentration de l'ester dans le solvant après extraction.
- K : Coefficient de distribution du composé entre le solvant et l'alcool.

On a :

$$K = \frac{Q_s}{(300\text{-}x)} \cdot \frac{x}{Q_a} = \frac{Q_s \cdot x}{(300\text{-}x)\ (Q_0 - Q_s)}$$

Le rapport R étant égal à :

$$\frac{x}{(300\text{-}x)}$$

On démontre que :

$$\frac{C_s}{C_0} = \frac{K}{\frac{K}{R} + 1}$$

Si :

$$R \to \infty \quad \frac{C_s}{C_0} \to K$$

Donc, pour avoir $C_s$ maximum, il faut $\frac{K}{R}$ minimum, c'est-à-dire R le plus élevé possible. En pratique, dans le cas qui nous intéresse, un rapport R = 10 s'avère suffisant pour l'analyse.

Après extraction pendant 300 tours, le chlorure de méthylène est récupéré et 5 µl sont injectés sur une colonne DEGS 4 m 1/8 à 10 p. 100 sur chrom W 60-80 mesh.

Température du four : programmation de 60 à 170°C à 3°C/mn.

## 2. — *Résultats*

La figure 3 représente un chromatogramme obtenu avec un rhum de Martinique.

Les tableaux 2 et 3 indiquent les résultats d'analyses effectuées par cette méthode sur divers échantillons d'eaux-de-vie et de rhums.

2. 1. *Eaux-de-vie de Cognac compte 0.*

Cette étude a été effectuée sur 26 eaux-de-vie de régions et d'années différentes.

Malgré des écarts assez importants sur le plan quantitatif, une étude plus détaillée montre que les proportions entre les différents esters d'un même cognac sont parti-

TABLEAU 2

*Esters éthyliques et furfural de différentes eaux-de-vie*
(Valeur moyenne en mg par litre d'alcool pur)

| | Cognac compte 0 | Cognac commercialisé | Armagnac | Brandies | Calvados | Blended whiskies | Malt whiskies | Bourbons |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Nombre échantillons | 26 | 6 | 7 | 6 | 5 | 8 | 1 | 3 |
| Éthyl caproate | 6 (5-8,5) | 6 (5-7,5) | 5 (2,5-6) | 5 (2,5-7,5) | 2,5 (0-5) | 2,5 (0-5) | 4 | 7,5 (5-10) |
| Éthyl caprylate | 45 (27,5-92,5) | 40 (27,5-52,5) | 20 (17,5-25) | 25 (12,5-35) | 15 (12,5-17,5) | 10 (5-17,5) | 27,5 | 30 (27,5-35) |
| Éthyl caprate | 95 (40-170) | 65 (52,5-77,5) | 10 (7,5-12,5) | 32,5 (12,5-47,5) | 25 (22,5-27,5) | 25 (12,5-35) | 75 | 52,5 (50-55) |
| Éthyl laurate | 64 (25-127) | 26 (22-35) | 2,5 (2-6) | 7,5 (5-10) | 10 (7,5-12,5) | 15 (7,5-25) | 47 | 25 (22,5-27,5) |
| Éthyl myristate | 8,5 (2,5-15) | + | traces | traces | + | + | + | + |
| Éthyl palmitate | 21 (15-30) | + + | + + | + + | + + | + + | + + + | + + + |
| Éthyl palmitoléate | 5 (2,5-10) | + | traces | + | + | + + + | + + + + | traces |
| Éthyl lactate | 224 (105-322) | 205 (100-300) | 120 (75-175) | 107 (37,5-225) | 125 (75-200) | traces | traces | traces |
| Diéthyl succinate | 9 (2,5-22,5) | 10 (5-15) | 11 (10-15) | 20 (10-35) | 5 (0-10) | traces | traces | 2,5 (0-7,5) |
| Furfural | non dosé | 22,5 (17,5-27,5) | 7,5 (6-14) | traces (0-5) | traces | 10 (6-17) | 32 | 27,5 (25-32,5) |

| *Observations* | | | |
|---|---|---|---|
| | *Calvados :* Quantité importante de β-phénéthyl acétate, d'hexanol et d'un acétal (triéthoxy propane) | *Blended whiskies* Présence d'éthyl 9-décénoate | *Malt whiskies* Présence d'éthyl 9-décénoate |

*N. B.* : Les chiffres entre parenthèses sont les valeurs extrêmes.

TABLEAU 3

*Esters éthyliques et furfural de différents rhums*
(Valeur moyenne en mg par litre d'alcool pur)

| | Martinique | Madagascar | Guadeloupe | Réunion | Jamaïque | Grand fond galion | Rhum léger France | Rhum léger étranger |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Nombre échantillons | 4 | 2 | 2 | 4 | 4 | 3 | 2 | 4 |
| Éthyl caproate | 1,2 (0-2,5) | traces | 1,2 (0-2,5) | 12,5 (2,5-25) | 60 (15-100) | traces | 1,2 (1,2-1,2) | traces |
| Éthyl caprylate | 12,5 (10-15) | 13,5 (10-17) | 10 (10-10) | 9 (5-12,5) | 11 (10-12,5) | 2,5 (2,5-2,5) | 1,5 (0,7-2,5) | 3 (2,5-4,5) |
| Éthyl caprate | 29 (17-42) | 31 (25-37) | 21 (20-22,5) | 17 (7-25) | 14 (12-20) | 5 (2,5-7,5) | 0,6 (0-1,25) | 2,5 (2,2-2,7) |
| Éthyl laurate | 17,5 (11,0-22) | 12,5 (10-15) | 22,5 (15-30) | 9 (5-10) | 9 (2,5-16) | 6 (4-7,5) | traces | traces |
| myristate | 7,5 (2,5-15) | 6 (0-12,0) | 2,5 (0-5) | 2,5 (0-5) | 2,5 (0-5) | 4 (4-4) | traces | traces |
| Éthyl palmitate | 10 (2,5-20) | 6 (2-10) | 9 (7,5-10) | 5 (0-10) | 20 (5-32) | 10 (7,5-14) | traces | traces |
| Éthyl palmitoléate | 5 (0-20) | 5 (0-10) | 4 (3,0-5) | 1,2 (0-5) | traces | 4 (0-12) | traces | traces |
| Éthyl lactate | 32 (0-115) | traces | 12,5 (0-25) | 80 (37-137) | 80 (25-100) | 130 (87-175) | traces | traces |
| Isoamyl acétate | 2,5 (0-5) | 2 (0-4) | 6 (5-7) | 7,5 (0-15) | 28 (17-42) | traces | traces | traces |
| Furfural | traces | traces | traces | traces | 55 (30-72) | traces | traces | traces |

*N. B.* : Les chiffres entre parenthèses sont les valeurs extrêmes.

culièrement constantes d'une région ou d'une année sur l'autre (travaux personnels non publiés), c'est-à-dire que le « profil » aromatique présente une constance assez remarquable (ceci traduit certainement une standardisation poussée du procédé d'élaboration et une constance de la flore levurienne).

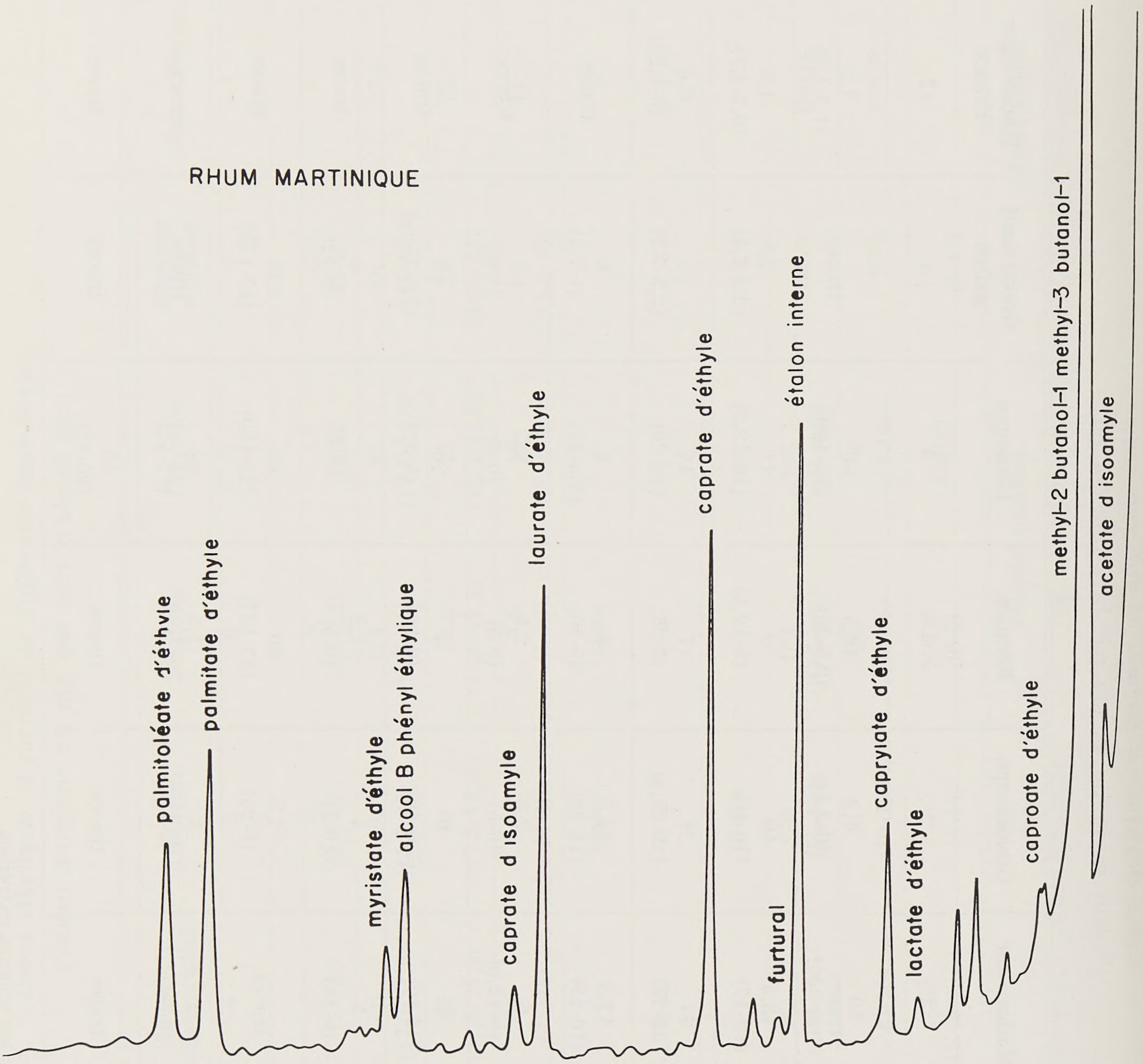



Fig. 3. — *Chromatogramme des esters éthyliques d'un rhum*

2. 2. *Cognac commercialisé.*

Une diminution de la quantité d'esters éthyliques d'acides gras à nombre de carbones élevé est notée, ce qui traduit certainement l'influence de la diminution du degré alcoolique à 40°GL suivi d'un traitement frigorique de stabilisation.

2. 3. *Armagnac.*

L'ester éthylique d'acide gras le plus important de ce type d'eau-de-vie est le caprylate, alors que le caprate prédomine dans les cognacs. Les quantités d'esters sont moindres dans les armagnacs que dans les cognacs.

2. 4. *Brandies.*

Il n'existe pas, dans ce type d'eau-de-vie, de caractère particulier par rapport aux cognacs, sinon des quantités d'esters plus faibles et une dispersion importante des résultats.

2. 5. *Calvados.*

Ces eaux-de-vie se caractérisent par des quantités importantes d'hexanol, de triéthoxypropane (supérieures à 20 mg par litre d'alcool pur) et des quantités de β-phénéthyl acétate (de l'ordre de 2 à 3 mg par litre d'alcool pur).

2. 6. *Whiskies* (blented et malt).

La caractéristique essentielle des whiskies est la présence d'éthyl palmitoléate en quantités supérieures à l'éthyl palmitate. Il faut également noter la présence d'éthyle 9 décénoate (identification probable) et de β-phénéthyl acétate.

2. 7. *Bourbons.*

Ces eaux-de-vie, à la différence des whiskies, ne possèdent pas des quantités importantes d'éthyle palmitoléate

2. 8. *Rhums.*

Dans le tableau 3, on constate que les rhums Martinique, Madagascar et Guadeloupe (industriels ou agricoles), présentent un « profil aromatique » très voisin. En ce qui concerne les rhums Réunion, les différences enregistrées, au niveau de l'éthyl caproate notamment, sont dues à deux rhums de caractère assez particulier, possédant des quantités assez importantes d'éthyl caproate. Les rhums Jamaïque se caractérisent essentiellement par des quantités très importantes d'éthyl caproate. Les rhums « Grande Fond Galion » présentent des quantités plus faibles d'esters éthyliques d'acides gras, mais, en revanche, des quantités assez importantes d'éthyl lactate.

Les différences enregistrées entre les rhums légers français et les rhums légers étrangers traduisent certainement des procédés d'élaboration dissemblables.

## III. — ÉTUDE QUALITATIVE DES RHUMS : PRÉSENCE DE COMPOSÉS PARTICULIERS

### 1. — *Technique d'extraction*

1. 1. *Appareillage.*

L'appareil utilisé est l'extracteur de Mascre, déjà décrit.

1. 2. *Solvant.*

Le solvant utilisé dans ce cas est le *n*-pentane, choisi pour sa très bonne volatilité et le fait qu'il extrait peu d'alcool (Boidron, 1966).

1. 3. *Choix du rapport.*

$$\frac{\text{Volume d'alcool}}{\text{Volume de solvant}} = R$$

Dans le cas présent, étant donné que l'extrait sera concentré au maximum, il faudra choisir R optimal de telle façon que $Q_s$ soit maximal (pour un composé donné).

$Q_s$ sera maximal pour $R = \sqrt{K}$. Dans ce cas, le choix de R sera donc fonction du coefficient de distribution du composé à extraire. Étant donné que pour les composés à extraire K sera voisin ou supérieur à 20, l'extraction sera effectuée avec R = 5, soit 250 ml d'eau-de-vie à 40°GL et 50 ml de pentane.

1. 4. *Méthode.*

Deux cent cinquante ml de rhum sont extraits par 50 ml de pentane sur l'appareil de MASCRE pendant 300 tours. L'extrait pentanique récupéré est séché sur sulfate de sodium anhydre puis concentré à 2 ml environ, dans un ballon à queue surmonté d'un réfrigérant à air, sur bain marie à 60°C. Le pentane concentré est repris avec une pipette Pasteur et placé dans un tube effilé sur lequel le vide est fait, de façon à éliminer complètement le pentane. L'extrait huileux est ainsi obtenu à un volume de l'ordre de 0,5 à 5 µl.

L'analyse est effectuée sur colonne SCOT FFAP d'une longueur de 100 pieds, et de diamètre interne de 0,02 pouces (colonne en acier inox). Cette colonne est placée dans un couplage chromatographe-spectromètre de masse Perkin-Elmer 270. La quantité injectée est de 0,15 µl.

Conditions : température du four : programmation de 80 à 210°C à 4°C/mn.

## 2. — *Résultats*

2. 1. — *Rhum Jamaïque* (8 échantillons analysés).

La figure 4 représente un chromatogramme type d'un rhum Jamaïque.

Ces rhums très typiques se caractérisent surtout par des quantités très importantes de composés volatils (esters éthyliques d'acides à nombre de carbones compris entre 2 et 6, et acétals, notamment diéthoxyéthane, diéthoxyisobutane et diéthoxyisopentane). Ces rhums contiennent également des quantités non négligeables d'esters éthyliques d'acides gras, à nombre impair de carbones ($C_7$, $C_9$ et $C_{15}$).

Il faut noter, dans ce type de rhums, la présence de deux triméthyl tétrahydronaphtalènes (TTN) et d'un triméthyl dihydronaphtalène (TDN). Ces composés ont été identifiés grâce à leurs spectres de masse caractéristiques, publiés par LIEBICH, KŒNIG et BAYER (1970), qui les avaient également trouvés dans un rhum Jamaïque.

Deux rhums Jamaïque présentaient de faibles quantités de menthol et de 2 sesquiterpènes, l'un de masse M = 204 (pic n° 8) avec le spectre de masse : 41(100) 119(69) 93(66) 41(58) 55(53) 27(49) 95(42) 111(31), l'autre de masse M = 202, correspondant à l'ar-curcumène.

Les six autres rhums Jamaïque étudiés contenaient des quantités notables de propyl caproate, d'isobutyl caproate, d'isoamyl caproate et d'héxyl caproate, ainsi que des quantités importantes (supérieures à 5 mg/litre d'alcool pur) de méthyl chavicol et d'α-terpinéol.

Il faut également noter la présence, dans tous les rhums Jamaïque, d'un acétal particulier le triéthoxypropane (1), à raison de 1 à 10 mg/litre d'alcool pur environ. Le spectre de masse de ce composé est donné figure 5. La présence de cet acétal a été signalée dans des whiskies « poivrés » par KAHN, LARDE, CONNER (1968), et, plus récemment, par DUBOIS, PARFAIT, DEKIMPE (1973) dans un rhum à goût anormal. En fait, la présence de cet acétal, loin d'être exceptionnelle, est au contraire courante, puisque nous l'avons trouvé, en quantité très variable il est vrai, dans différents rhums et whiskies. De plus, c'est un constituant important du Calvados.

(1) Produit commercialisé par Aldrich Europe.

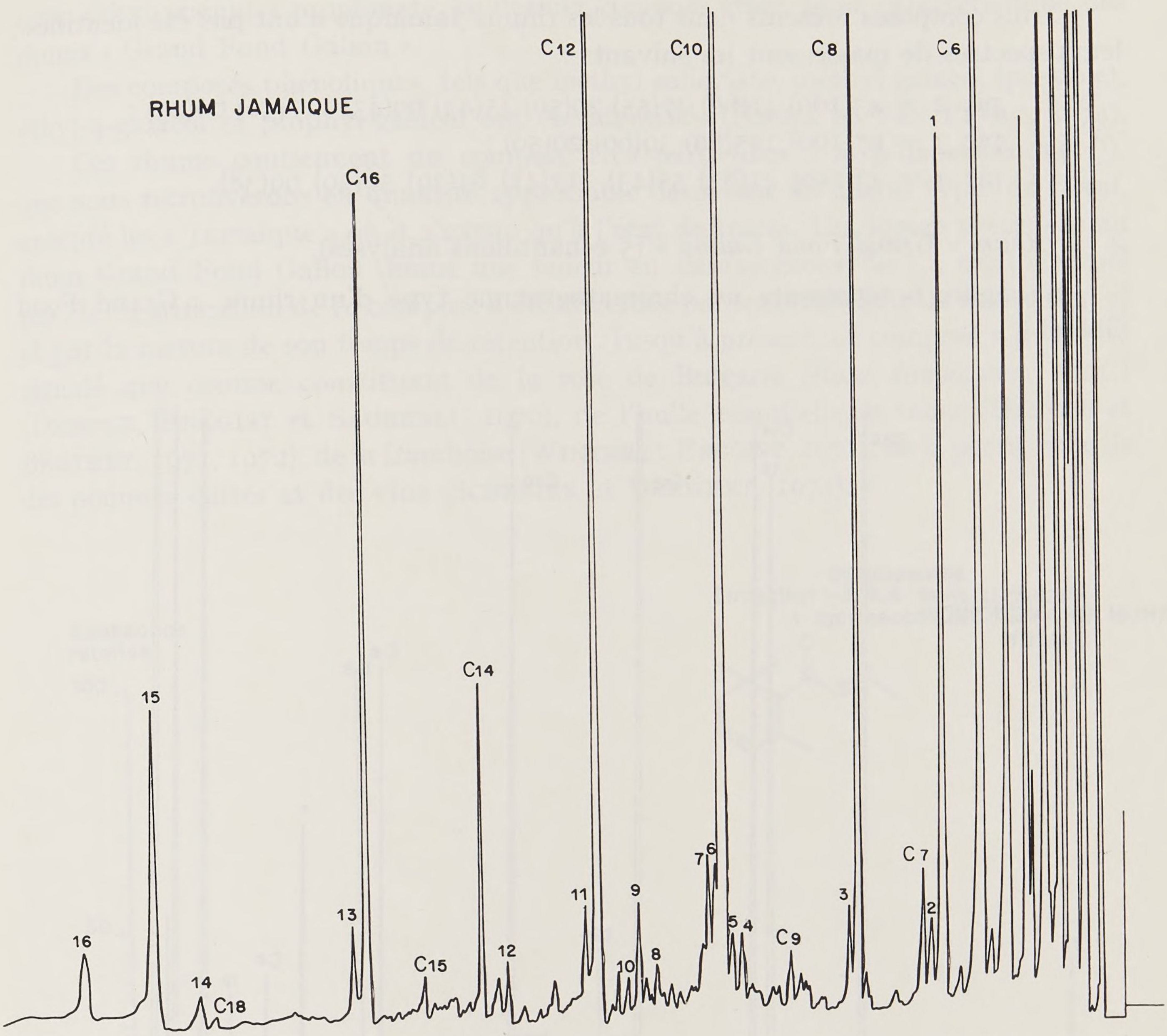



Fig. 4. — *Chromatogramme type d'un rhum Jamaïque*

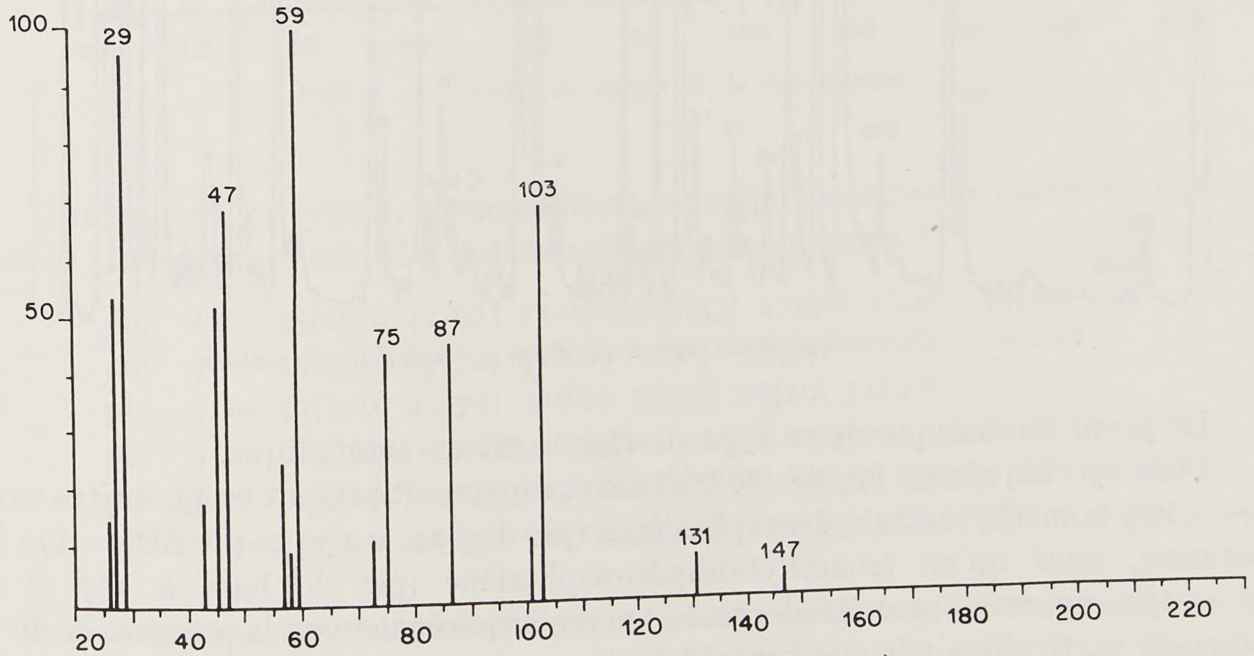



Fig. 5. — *Spectre de masse du Triéthoxypropane*

Trois composés présents dans tous les rhums Jamaïque n'ont pas été identifiés ; leurs spectres de masse sont les suivants :

pic 2 = 43(100) 41(60) 27(55) 29(50) 45(43) 99(43) 117(30) 60(25) ;
pic 3 = 97(100) 125(69) 39(60) 29(59) ;
pic 4 = 43(100) 41(83) 55(43) 117(41) 84(39) 56(39) 99(38).

2. 2. *Rhum « Grand Fond Galion »* (5 échantillons analysés).

La figure 6 représente un chromatogramme type d'un rhum « Grand Fond Galion ».

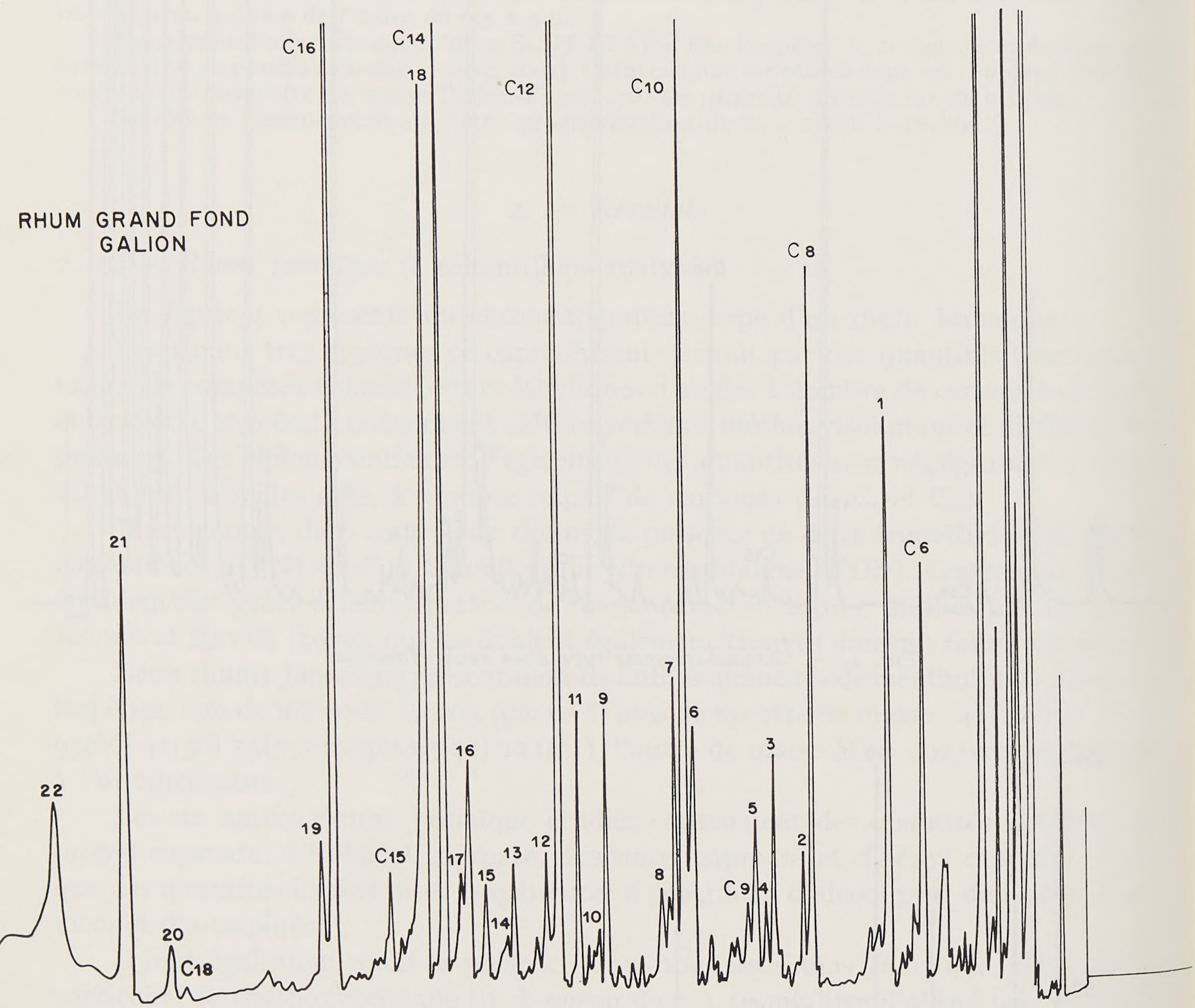



FIG. 6. — *Chromatogramme type d'un rhum « Grand Fond Galion*

Le profil aromatique de ce type de rhums est caractéristique.

Dans les cinq rhums étudiés, le triéthoxypropane est présent en quantités variables. Cinq triméthyl tétrahydronaphtalènes (pic de base à 159 et pic $M^+ = 174$ importants), ainsi qu'un triméthyl-dihydronaphtalène (pic de base à 157 et pic $M^+ = 172$ importants) ont été identifiés. On remarque également la présence de divers composés particuliers tels que benzaldéhyde, menthol, éthyl benzoate, diéthylsucci-

nate, éthyl-phényl-3 propionate, ce dernier composé étant assez caractéristique des rhums « Grand Fond Galion ».

Des composés phénoliques, tels que méthyl salicylate, méthyl gaïacol (possible), éthyl-4-gaïacol et prophyl-gaïacol ont été identifiés (HRUZA et VAN PRAAC, 1974).

Ces rhums contiennent un composé très particulier : la β-damascénone [1], que nous retrouverons en quantité appréciable dans tous les autres types de rhum, excepté les « Jamaïque » où il n'existe qu'à l'état de traces. Un dosage précis sur un rhum Grand Fond Galion donne une teneur en damascénone de 1,4 mg/l d'alcool pur. L'identification de ce composé a été effectuée par spectrométrie de masse (fig. 7) et par la mesure de son temps de rétention. Jusqu'à présent, ce composé n'avait été signalé que comme constituant de la rose de Bulgarie (*Rosa damascena*, MILL.) (DEMOLE, ENGGIST et SAUBERLI, 1970), de l'huile essentielle de tabac (DEMOLE et BERTHET, 1971, 1972), de la framboise (WINTER et ENGGIST, 1971), de la partie volatile des pommes cuites et des vins (SCHREIER et DRAWERT, 1974).

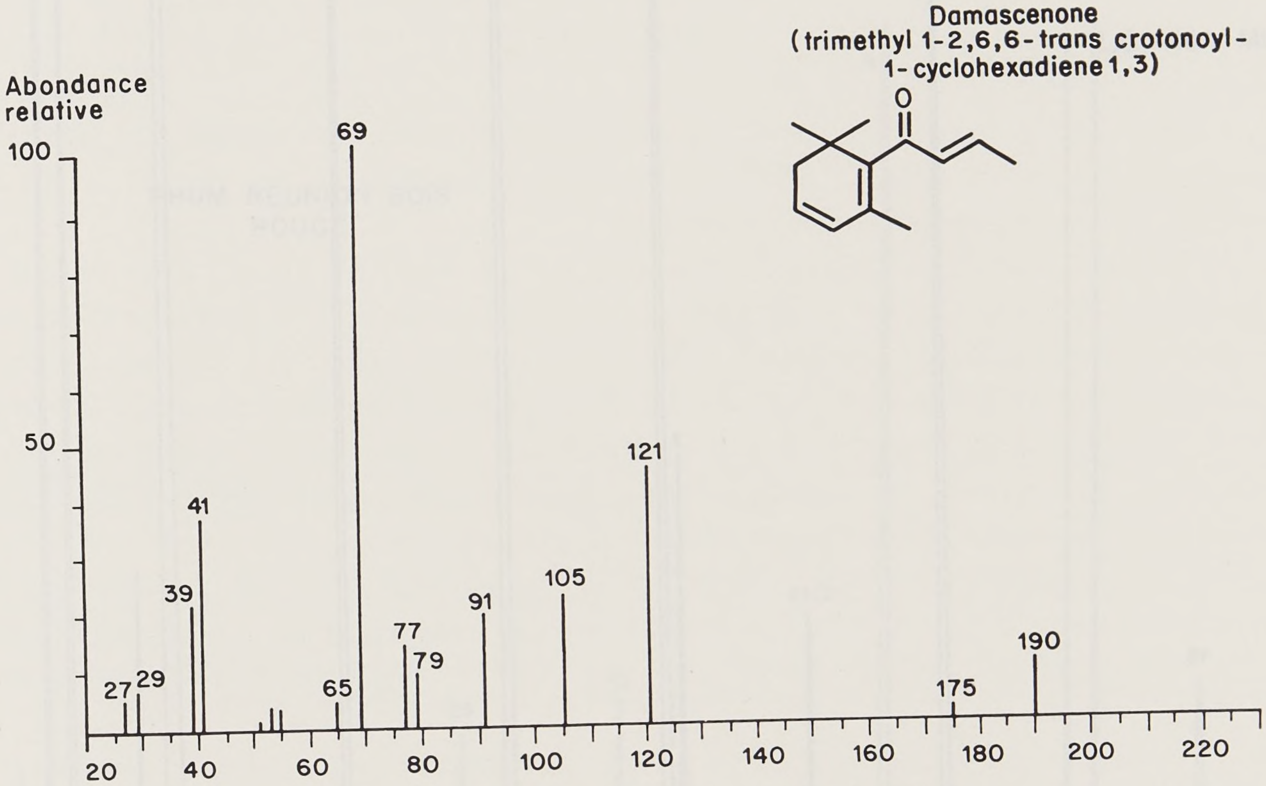



FIG. 7. — *Spectre de masse de la damascénone*

D'autre part, ce type de rhum contient un certain nombre de composés que nous n'avons pas encore identifiés, notamment les pics suivants :

pic 2 = 55(100) 41(91) 111(76) 29(53) 27(48) 43(47) 39(44) ;
pic 3 = 43(100) 87(72) 41(68) 59(64) 55(56) ;
pic 5 = 43(100) 41(70) 27(60) 55(54) 29(49) 71(40) ;
pic 9 = 165(100) 137(71) 135(60) 91(47) 134(29) 43(27) $M^+ = 180$ ;
pic 13 = 43(100) 41(79) 91(68) 105(62) 29(57) 55(55) $M^+ = 190$
pic 15 = 43(100) 41(95) 91(77) 39(65) 105(53) 55(59) $M^+ = 192$.

[1] Nous remercions la Société Firmenich d'avoir bien voulu nous procurer un échantillon de ce produit (nom commercial : Doricenone).

2. 3. *Rhums agricoles* (6 échantillons analysés).

La figure 8 représente un chromatogramme type de rhum agricole. Ce type de rhumpossè de des caractères moins marqués que les précédents. On peut même considérer que le profil chromatographique de ce type de rhum est plus proche de celui d'un cognac ou brandy que d'un « Jamaïque » ou d'un « Grand Fond Galion ». L'analyse de ces six rhums agricoles a montré une parfaite constance de ce type de produit, dans lequel n'existe que des quantités moyennes de triéthoxypropane, des traces de TTN et des quantités minimes de menthol et de damascénone. Le dosage de la damascénone dans un rhum agricole de la Martinique donne une teneur de 0,25 mg/l d'alcool pur.

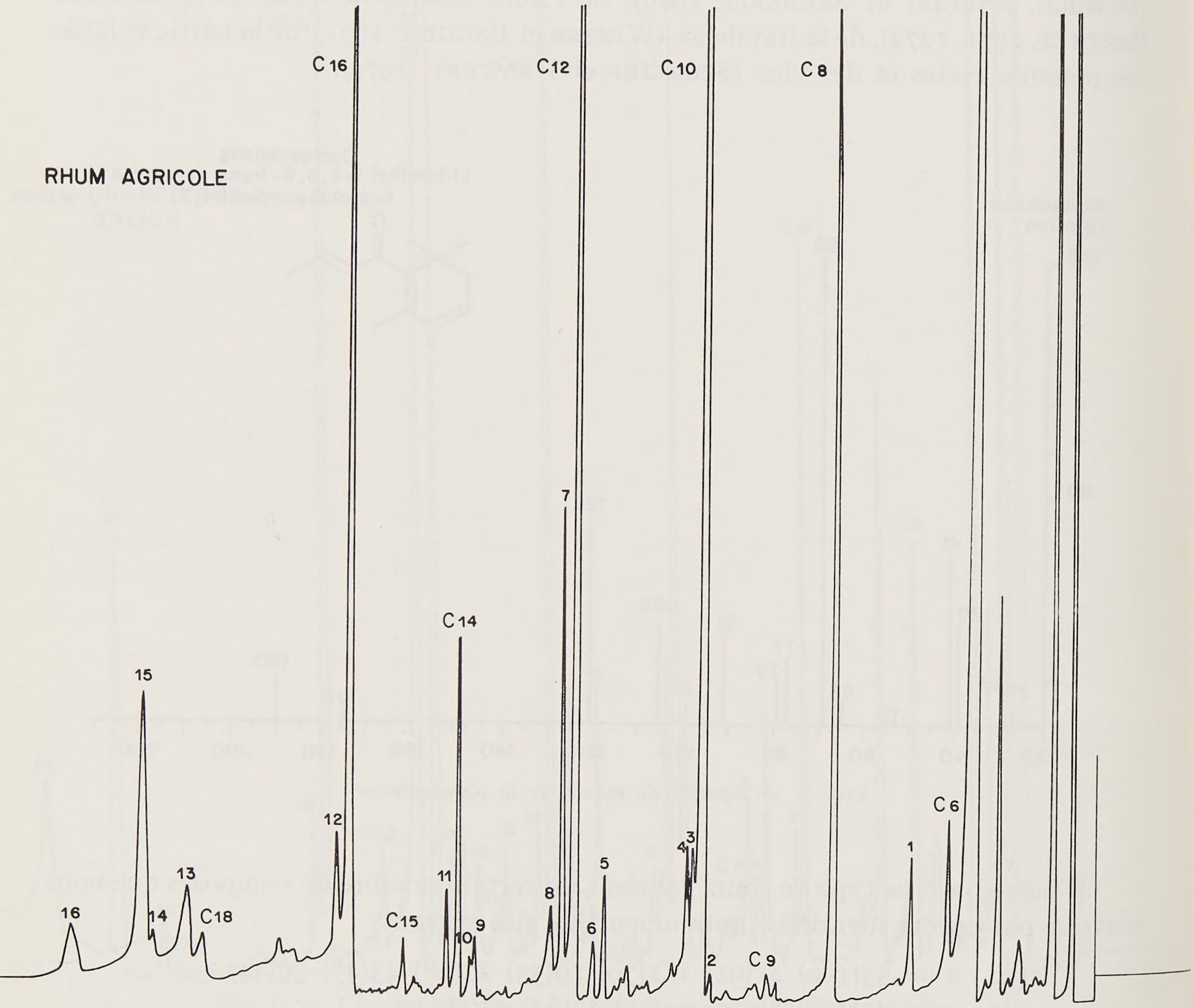



Fig. 8. — *Chromatogramme type d'un rhum agricole*

2. 4. *Rhums industriels* (8 échantillons analysés).

Ces rhums possèdent un profil chromatographique voisin de celui des rhums agricoles, avec cependant une plus grande diversité, notamment au niveau des constituants mineurs. Par exemple, pour un rhum de Madagascar, on trouve des

quantités de l'ordre du milligramme par litre d'alcool pur pour les TTN et TDN. Le dosage précis de la damascénone dans un rhum industriel donne une teneur de 1,5 mg/litre d'alcool pur.

Il faut également noter la présence, dans ce rhum ainsi que dans un rhum de la Guadeloupe, d'un isomère de l'eugénol, dont le spectre de masse est le suivant : 164(100) 91(75) 77(68) 41(67) 78(66) 43(52) 149(49) 121(48). Le temps de rétention de ce composé est inférieur à celui de l'eugénol sur colonne FFAP.

Dans trois rhums provenant de Porto Rico et de Guyane, la présence d'une lactone avec pic de base à $m/e = 99$ a été relevée. Il s'agit très probablement de la β-méthyl γ-octalactone ; son spectre de masse est très proche de celui donné par OTSUKA, ZENIBAYA et ITOH (1974). Ce composé a également été identifié dans les Bourbons.

2. 5. *Rhums de la Réunion « Bois rouge »* (3 échantillons) *et « Quartier Français »* (1 échantillon).

La figure 9 représente un chromatogramme type d'un rhum « Bois Rouge ».

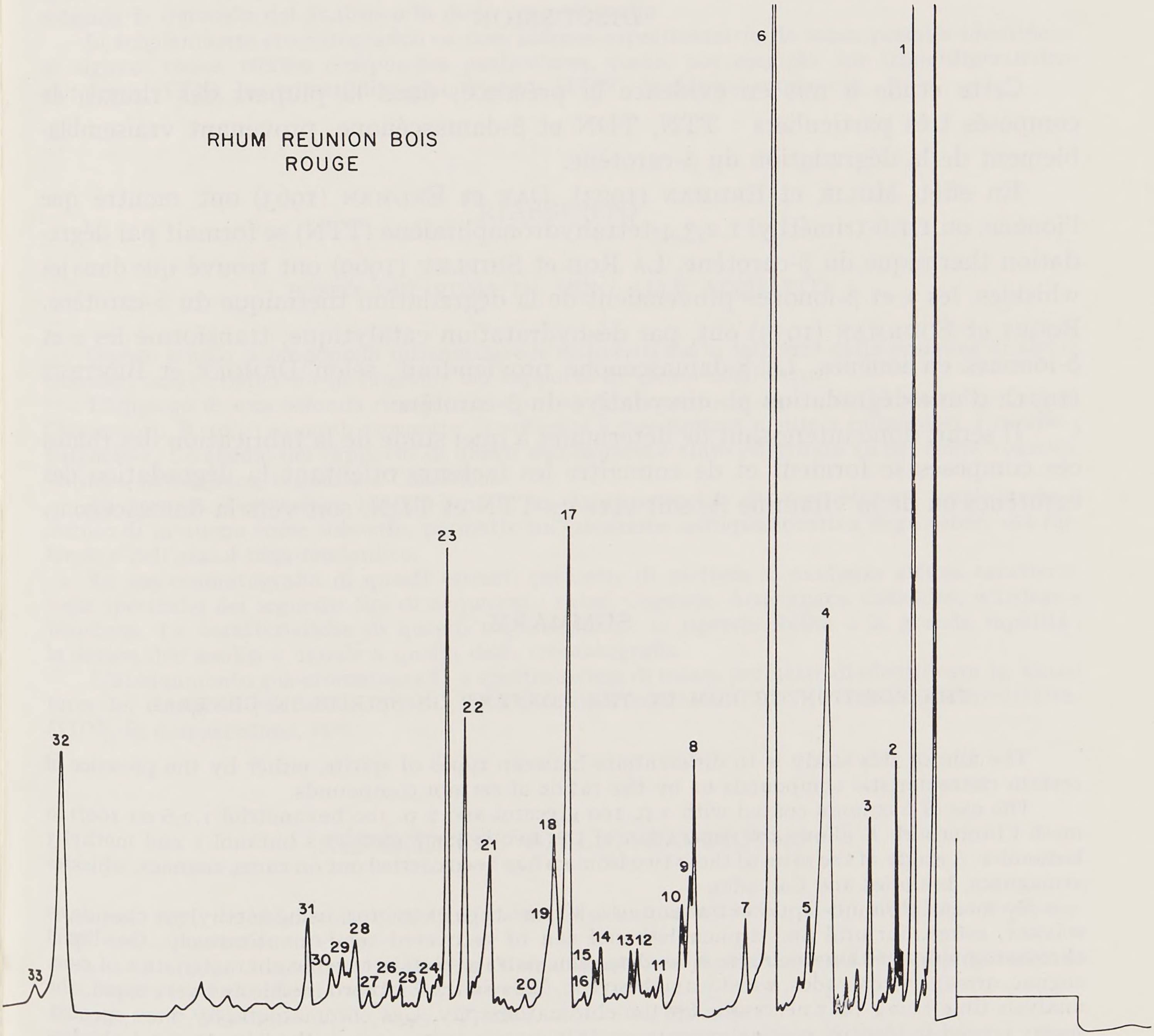



FIG. 9. — *Chromatogramme type d'un rhum « Bois Rouge »*

L'analyse des trois rhums « Bois Rouge » a montré qu'ils avaient une composition assez voisine, les principaux caractères de ces rhums étant des quantités importantes de triéthoxypropane (supérieures à 10 mg par litre d'alcool pur), la présence de 9 pics présentant un spectre de masse proche du triméthyl tétrahydronaphtalène, de deux pics de triméthyl dihydronaphtalène des quantités (supérieures à 5 mg par litre d'alcool pur) de méthyl salicylate et de damascénone. Le composé isomère de l'eugénol, noté précédemment dans les rhums de Madagascar et de la Guadeloupe, est également présent.

L'un de ces trois rhums, très riche en TTN et TDN, contenait également les deux composés inconnus signalés dans les « Grand Fond Galion » (pics 13 et 15 de masses 190 et 192 respectivement).

Le rhum « Quartier Français » présente les caractères d'un rhum industriel, avec cependant des quantités plus importantes de damascénone et de méthyl salicylate.

## DISCUSSION

Cette étude a mis en évidence la présence, dans la plupart des rhums, de composés très particuliers : TTN, TDN et β-damascénone, provenant vraisemblablement de la dégradation du β-carotène.

En effet, MULIK et ERDMAN (1963), DAY et ERDMAN (1963) ont montré que l'ionène, ou 1,1,6-triméthyl 1,2,3,4-tétrahydronaphtalène (TTN) se formait par dégradation thermique du β-carotène. LA ROE et SHIPLEY (1969) ont trouvé que dans les whiskies, les α et β-ionones provenaient de la dégradation thermique du β-carotène. BOGET et FOURMAN (1933) ont, par déshydratation catalytique, transformé les α et β-ionones en ionènes. La β-damascénone proviendrait, selon DEMOLE et BERTHET (1971), d'une dégradation photoxydative du β-carotène.

Il serait donc intéressant de déterminer à quel stade de la fabrication des rhums ces composés se forment et de connaître les facteurs orientant la dégradation des carotènes ou de la vitamine A, soit vers les TTN et TDN, soit vers la damascénone.

## SUMMARY

### THE POSITION OF RUM IN THE CONTEXT OF SPIRITS IN GENERAL

The aim of this study is to differentiate between types of spirits, either by the presence of certain characteristic compounds or by the ratios of certain compounds.

The use of a column coated with 2 p. 100 glycerol and 2 p. 100 hexanetriol-1,2,6 on 100/120 mesh Chromosorb R allows the separation of the two isomers methyl-2 butanol-1 and methyl-3 butanol-1. A study of the ratio of these two isomers has been carried out on rums, cognacs, whiskies armagnacs, brandies and Calvados.

By means of liquid-liquid extraction in a Mascré-type extractor, using methylene choride as solvant, esters, furfural and 2-phenylethanol can be recovered semi-quantitatively. Gas-liquid chromatography of these extracts is used to demonstrate certain specific characteristics of rum, cognac, armagnac, calvados, whisky and bourbon. This method is reproducible and very rapid, the analysis time being that necessary for the chromatography. Gas chromatography-mass spectrometry is used to identify particular compounds in certain rums, such as the trimethyl-tetrahydronaphthalenes (TTN), trimethyl-dihydronaphtalenes (TDN), damascenone, etc.

## RESUMEN

### LUGAR DE LOS RONES EN EL CAMPO DE LOS AGUARDIENTES

El objeto de este estudio consiste en establecer la diferencia entre los aguardientes, ya sea por la presencia de ciertos compuestos característicos, o bien, por la relación entre ciertos componentes.

La utilización de una columna llena a razón de un 2 p. 100 de glicerol y de un 2 p. 100 de hexanetriol-1,2,6 sobre Chromosorb R 100-120 mesh permite la separación de los dos isómeros metil-2 butanol-1 y metil-3 butanol-1. El estudio de la relación de estos dos isómeros han sido efectuado con rones, cognacs, whiskis, Armagnacs, brandies y Calvados.

La técnica de extracción líquido-líquido en un aparato de tipo Mascré, con utilización de cloruro de metileno como disolvente, permite una extracción semicuantitativa de los ésteres, del furfural y del alcohol beta-feniletílico.

La cromatografía en fase gaseosa de estos extractos permite evidenciar algunas de las características específicas de los aguardientes siguientes : rones, Cognacs, Armagnacs, Calvados, whiskis y bourbones. Este método se caracteriza por su reproductibilidad y su gran rapidez, quedando reducida la duración del análisis a la de la cromatografía.

El acoplamiento cromatográfico en fase gaseosa-espectrometría de masa permite identificar, en algunos rones, ciertos compuestos particulares, como, por ejemplo, los trimetiltetrahidronaftalenos (TTN), los trimetildihidronaftalenos (TDN), la damascenona, etc.

## RIASSUNTO

### POSTO DEI RUMS IN SENO ALLE ACQUAVITI

Questo studio si propone di differenziare le acquaviti sia in funzione della presenza di alcuni composti caratteristici sia in funzione del rapporto di alcuni costituenti.

L'impiego di una colonna riempita a 2 p. 100 di glicerolo e a 2 p. 100 d'esanetriolo-1,2,6 su Chromosorb R 100-120 mesh permette di separare i due isomeri metile-2 butanolo-1 e metile-3 butanolo-1. Lo studio del rapporto di questi due isomeri è stato effettuato su dei rums, cognacs, whiskies, armagnacs, brandies e Calvados.

La tecnica d'estrazione liquido-liquido in un apparecchio del tipo Mascré, impiegando il cloruro di metilene come solvente, permette un'estrazione semiquantitativa degli esteri, del furfurolo e dell'alcool beta-feniletilico.

La gas-cromatografia di questi estratti permette di mettere in evidenza alcune caratteristiche specifiche dei seguenti tipi di acquaviti : rums, Cognacs, Armagnacs, Calvados, whiskies e bourbons. Le caratteristiche di questo metodo sono : la riproducibilità e la grande rapidità ; la durata dell'analisi è uguale a quella della cromatografia.

L'abbinamento gas-cromatografia e spettrometria di massa permette di identificare in alcuni rums dei composti particolari quali i trimetiltetraidronaftaline (TTN), i trimetildiidronaftaline (TDN), la damascenone, ecc.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Anonyme, 1973. Méthodes officielles d'analyse des alcools et eaux-de-vie. *J. Off. République Française*, **38**, 2 oct., 1231-1266.

Baraud J., 1961. Étude quantitative par chromatographie en phase vapeur des alcools et des esters de la fermentation alcoolique. *Bull. Soc. Chim.*, **10**, 1874-1875.

Bogert M. I., Fourman V. G., 1933. *J. amer. chem. Soc.*, **55**, 4660.

Boidron J. N., 1966. *Essai d'identification des constituants de l'arôme des vins de* Vitis vinifera L. Thèse 3[e] cycle, Faculté des Sciences, Bordeaux.

BRUNELLE R. L., 1967. Evaluation of gas liquid chromatography for the determination of the fusel oil in distilled spirits. *J. Ass. Off. Agr. Chemists,* **46** (2), 294-297.

BRUNELLE R. L., 1968. Collaborative study of the quantitative determination of fusel oil and the ethyl acetate by gas liquid chromatography. *J. Ass. Off. Agr. Chemists,* **51** (4), 915-921.

DAY W. C., ERDMAN J. G., 1963. *Science,* **141,** 808.

DEMOLE E., BERTHET D., 1971. *Helv. Chim. Acta,* **54,** 681.

DEMPLE E., ENGGIST P., SAUBERLI U., 1970. *Helv. Chim. Acta,* **53,** 541.

DEMOLE E., BERTHET D., 1972. *Helv. Chim. Acta,* **55,** 1866.

DUBOIS P., PARFAIT A., DEKIMPE J., 1973. Présence de dérivés de l'acroléine dans un rhum à goût anormal. *Ann. Technol. agric.,* **22** (2), 131-135.

FLANZY M., JOURET C., 1963. Contribution à l'étude des eaux-de-vie d'Armagnac par chromatographie en phase vapeur. *Ann. Technol. agric.,* **12** (1), 39-50.

GUYMON H., 1970. Composition of California commercial brandy distillates. *Annual meeting of the american Society of Enologists, Coronado,* Calif, June 25-27.

HRUZA D. E., VAN PRAAC M., 1974. Isolation and identification of the components of the tar of hickory wood stoke. *J. agric. Food Chem.,* **22** (1), 123-126.

JOURET C., MOUTOUNET M., 1968. Comparaison des alcools supérieurs des eaux-de-vie d'Armagnac et des whiskies. *Ann. Technol. agric.,* **17** (2), 151-158.

KAHN J. H., BLESSINGER E. T., 1972. Collaborative study of the quantitative gas liquid chromatographic determination of the fusel oil and other components in whisky. *J. Ass. Off. Agr. Chemists,* **55** (3), 549-556.

LIEBICH H. M., KOENIG W. A., BAYER E., 1970. Analysis of the flavor of rum by gas liquid chromatography and mass spectrometry. *J. Chromat. Sci.,* **8,** 527-533.

LA ROE E. G., SHIPLEY P. A., 1970. *J. Agr. Food Chem.,* **18** (1), 174-175.

MASCRE, 1957. *Ann. pharm. franç.,* **15,** 421.

MULIK J. D., ERDMAN J. G., 1963. *Science,* **141,** 806.

OTSUKA K., ZENIBAYA Y., ITOH M., 1974. Presence and significance of two diastereomers of β-methyl γ-octalactone in aged distilled liquors. *Agr. Biol. Chem.,* **38** (3), 485-490.

PORCARO P. J., JOHNSTON V. D., 1961. *Analyst Chem.,* **33,** 361.

SCHOENEMAN R. L., DYER R. H., 1968. Analytical profile of cistern room whiskies. *J. Ass. Off. Agr. Chemists,* **51** (5), 973-987.

SCHOENEMAN R. L., DYER R. H., 1973. Analytical profile of scotch whiskies. *J. Ass. Off. Agr. Chemists,* **56** (1), 1-10.

SCHREIER P., DRAWERT F., 1974. Gaschromatographisch-Massenspektrometrische Untersuchung flüchtiger Inhaltsstoffe des Weines. Unpolare Verbindungen des Weinaromas. *Z. Lebensm.-Unters. Forsch,* **154,** 273-278.

SIHTO E., NYKANEN L., SUOMALAINEN H., 1964. Gas chromatography of the aroma compounds of alcoholic beverages. *Qual. Plant. Mat. veg.,* **11** (2-4), 211-228.

SINGER D. D., STILES J. W., 1965. The determination of higher alcohols in potable spirits : comparison of colorimetric and gas chromatographic methods. *Analyst,* **90,** 290-296.

SINGER D. D., 1966. The proportion of 2-methyl-butanol and 3-methyl-butanol in some brandies and whiskies as determined by direct gas chromatography. *Analyst,* **91,** 790-794.

VAN DER KLOOT A. P., TENNEY R. T., BAVISSOTTO V., 1958. *Proc. Amer. Brew.,* **96.**

WEBB A. D., KEPNER R. E., 1961. Fusel oil analysis by means of liquid partition chromatography. *Amer. J. Enol. Vit.,* **12,** 51-69.

WINTER M., ENGGIST P., 1971. *Helv. Chim. Acta,* 1891.

*Ann. Technol. agric.*, 1975, **24** (3-4), 287-295.

# CULTIVO DE LEVADURA FORRAJERA EN MEZCLAS DE VINAZA Y MELAZA FINAL DE CAÑA

R. DELGADO, R. JIMÉNEZ, H. LINARES y C. GUTIÉRREZ

*Vice-direccion de Investigaciones y Desarrollo Minal, Ave. 41-4455, La Habana (Cuba)*

## RESUMEN

Se presenta un trabajo experimental sobre el efecto de la adición de melaza final a las vinazas de destilerías que se utilizan como sustrato en la producción de levadura forrajera. Se realizaron cultivos en lote y en continuo, en un fermentador de laboratorio totalmente instrumentado y con capacidad para 3 litros de medio. Se obtuvieron aumentos en el rendimiento de 16,5-30,5 y 44,6 p. 100 al adicionar respectivamente 0,5-1 y 2 p. 100 (P/P) de melaza. El rendimiento referido a la melaza añadida disminuyó desde aproximadamente 40 p. 100, para la adición de 0,5 p. 100, hasta valores próximos a 20 p. 100 para una adición de 4 p. 100. La cepa seleccionada mostró una gran capacidad de crecimiento, tanto en la vinaza pura como en las mezclas.

El proceso reduce la $DBO_5$ de la vinaza a menos del 50 p. 100.

## INTRODUCCIÓN

La utilización de las vinazas como sustrato para la producción de levadura forrajera ha sido ampliamente estudiada en los últimos 30 años. La composición de la vinaza es compleja y variable, debiéndose esto último a las diferencias en el proceso y al tipo y región de procedencia de la melaza que las origina, lo que exige una evaluación particular para cada proposición relativa a su empleo. La información disponible procede en su mayor parte de los estudios realizados con vinazas de remolacha, tales como los de ANNEMÜLLER (1954) y PARKOMCHUCK *et al.* (1971).

Este último reportó una producción de 11,8 a 12,7 g de levadura seca por litro de mezcla, en trabajos a escala piloto y complementando la vinaza con 1 p. 100 de melaza final, obteniéndose un rendimiento, respecto a esta última, de 30 p. 100 Cuando la adición se duplicó, (2 p. 100), el rendimiento se redujo a 22 p. 100.

Gonsalves de Lima (1964) y Almazán (1968) han presentado estudios sobre el cultivo de levadura en vinazas procedentes de melaza final de caña. Con flemas cubanas, el segundo reportó haber producido 12,3 g/l. Silinger y Almazán (1970) utilizaron mezclas de vinaza y melaza final alcanzando rendimientos de 18,9 a 19,7, referidos a la materia orgánica.

Harte y Webb (1967) han extendido el estudio de la poliauxia al cultivo continuo. Plantean que en estos sistemas el sustrato principal se consume casi instantáneamente, estableciéndose condiciones óptimas para la síntesis de enzimas inducidas, capaces de metabolizar el sustrato menos asimilable. El trabajo de Malanowska *et al.* (1968) parece confirmar lo anterior, al reportar que la vinaza y la melaza se consumían uniformemente.

De la información citada resalta un aspecto que requiere una atención especial. Dentro del intervalo investigado, la producción de levadura aumenta con la adición de melaza, mientras que el rendimiento sobre la base de la melaza añadida decrece. Por ello, el objetivo principal de este trabajo ha sido estudiar estos parámetros para diferentes proporciones de melaza en la mezcla, conjuntamente con la productividad y la reducción de la agresividad de la vinaza.

## MATERIALES Y METODOS

Se tomaron asépticamente y en días alternos seis muestras de vinaza de la destilería Santa-Cruz. Se mezclaron y distribuyeron en seis botellones de 20 l, donde se esterilizaron a 120°C durante 20 mn y almacenaron hasta la preparación de los medios. La melaza final utilizada en todas las corridas se obtuvo de una muestra representativa. Cuando se preparaban los medios, ya fueran de vinaza pura o mezclas, se esterilizaban y luego se clarificaban por sedimentación espontánea.

En la tabla 1 se muestra la composición de la vinaza y de la melaza utilizadas.

TABLA I

*Composición de las vinazas y melazas*

| Indice | Vinazas cubanas | Vinaza empleada | Melazas cubanas | Melaza empleada |
|---|---|---|---|---|
| oBx | 6,5 – 10,2 | 9,0 | 80,0 – 97,6 | 92 |
| pH | 4,2 – 5,0 | 4,5 | 4,70 – 6,30 | 5,0 |
| Acidez total GAcH/100 ml | 0,17 – 1,76 | 0,88 | 0,15 – 1,97 | – |
| Acidez volátil GAcH/100 ml | 0,08 – 0,25 | 0,175 | 0,08 – 0,75 | – |
| Aldehidos mg acetaldehido/100 ml | – | 0,77 | – | – |
| Esteres mg ac. etilo/100 ml | – | 0,43 | – | – |
| Etanol p. 100 (V/V) | 0,2 – 1,0 | 0,00 | – | – |
| Capacidad « Butler » ml $H_2SO_4$ 1N/100 g | 10 – 3,1 | 10,9 | 22 – 90 | 25 |
| Nitrógeno p. 100 (P/P) | 0,060 – 0,220 | 0,090 | 0,30 – 9,0 | 0,56 |
| $P_2O_5$ p. 100 (P/P) | 0,017 – 0,072 | – | 0,046 – 0,230 | 0,055 |
| Reductores totales p. 100 (P/P) | 0,90 – 1,20 | 1,0 | 48,0 – 70,85 | 52,0 |
| Reductores libres p. 100 (P/P) | 0,70 – 1,10 | 0,8 | 13,3 – 32,6 | 24,0 |
| Red. infermentables p. 100 (P/P) | – | 0,60 | 2,08 – 9,30 | 6,60 |
| Cenizas | 1,20 – 1,40 | 1,40 | 7,0 – 15,00 | 9,18 |

Los medios de cultivo se complementaron con úrea y fosfato diamónico, con un 20 p. 100 de exceso sobre el rendimiento esperado.

En las pruebas de selección intervinieron nueve cepas de *Candida utilis* y una de *C. tropicalis*, procedentes de la collección de la VDID. Las 10 cepas se mantenían en agar con una mezcla de vinaza y melaza a 30°C y pH de 4,5. Se hicieron pases cada 48 horas durante 14 días. A éste siguieron dos cultivos en zaranda de 15 y 45 ml a 120 oscilaciones/mn y 35°C. Las seis cepas que mostraron la mejor productividad fueron inoculadas con precisión en otra etapa de 110 ml. Se diseñó un sistema de bloques al azar con 6 repeticiones, con el fin de descriminar la mejor.

Las corridas experimentales en lote y continuo, se efectuaron en una instalación de laboratorio formada por un fermentador de 3 l, con agitación autorregulada y controles para el pH, la temperatura, el nivel de espuma, el flujo de aire y la dosificación del medio.

Se programó la realización de lotes con vinaza pura, 1 y 2 p. 100 en peso de melaza, que permitieran obtener alguna información general sobre el proceso y que a la vez fuera de utilidad para el desarrollo del cultivo continuo, siguiendo el método gráfico de LULDEKING y PIRET (1959). Las corridas correspondientes a 2 p. 100 de melaza se hicieron con alimentación incrementada de la misma, para mantener los reductores en un bajo nivel.

Las condiciones de operación fueron :

Volumen : 2 l ;
Temperatura : 35°C ;
pH : 4,5 ;
$K_{1a}$ : 180 mmoles $O_2$/l . h (método del sulfito) ;
Tiempo de fermentación : 12-14 h.

Los cultivos continuos se iniciaron a partir de lotes donde la biomasa se propagó hasta más de 1 p. 100 MS.

Los factores experimentales con los niveles correspondientes se presentan a continuación.

| *Factor* | *Nivel* |
|---|---|
| *a*) Proporción de melaza en la mezcla (p. 100 P/P) ; | 0-0,5-1-2-3 y 4 |
| *b*) Velocidad de dilución ($hr^{-1}$). | 0,27-0,35-0,42 y 0,45 |

Las condiciones de operación fueron como en los lotes, excepto el volumen que en este caso fue de 1,4 l y el $K_{1a}$ que se elevó a 200 mmoles $O_2$/l · h.

La duración del estado estacionario para cada velocidad de dilución fué de 5 a 7 h con determinaciones horarias de la concentración celular.

Las mediciones del crecimiento se realizaron según el método gravimétrico descrito por BORAN y ALMAZÁN (1968) y uno volumétrico.

Otras determinaciones fueron :

Reductores totales – Método EYNAR y LANE (Modificación ICIDCA, RUT y RODRIGUEZ (1966) ;
N total – Método KJEDAHL (AOAC, 1970) ;
$P_2O_5$ – Método espectroscópico (AOAC, 1970) ;
Cenizas – Método gravimétrico de Cenizas sulfatadas ;
Acidez total – (AOAC, 1970) ;
Acidez fija – (AOAC, 1970) ;
Aldehidos – (AOAC, 1970) ;
Esteres – (AOAC, 1970) ;
Etanol – Método GAY-LUSSAC ;
$DBO_5$ Método de AMSTRADT.

## RESULTADOS Y DISCUSION

### *Selección de la cepa*

Como puede verse en la tabla 2, la *C. utilis* n° 100 tuvo el mejor comportamiento, seleccionándose por ello para las corridas en lote y continuo.

TABLA 2

*Seleccion del microorganismo*

| Cepa | | Materia seca (¹) (p. 100) | Rendimiento (g/l) | Productividad (g/l · h) |
|---|---|---|---|---|
| *C. utilis* | C # 100 | 1,05[a] | 7,0 | 0,59 |
| *C. utilis* | C # CH-49 | 0,92[ab] | 5,7 | 0,48 |
| *C. tropicalis* | C # 164 | 0,88[bc] | 4,5 | 0,43 |
| *C. utilis* | C # 123 | 0,72[cd] | 3,7 | 0,30 |
| *C. utilis* | C # 204 | 0,64[d] | 2,9 | 0,24 |
| *C. utilis* | C # 136 | 0,56[d] | 2,1 | 0,18 |

(¹) Es de la media 0.05***.
*abcd* : valores en la misma columna sin letra en común, difieren en P — 0,05 (según la prueba de rango múltiple de DUNCAN).

## *Cultivos en lote*

Los resultados experimentales se muestran en la figura 1. No se observaron efectos poliáuxicos en ningún caso, lo que puede deberse a que realmente no ocurrieron o que por débiles no se detectaron por los métodos analíticos empleados. Esto puede explicarse por la presencia de los sustratos menos asimilables en todas las etapas previas de propagación, lo que pudo favorecer la inducción de las enzimas requeridas para su utilización.

El procesamiento de los resultados según el método gráfico de LUDEKING y PIRET (1959) no dió resultados satisfactorios

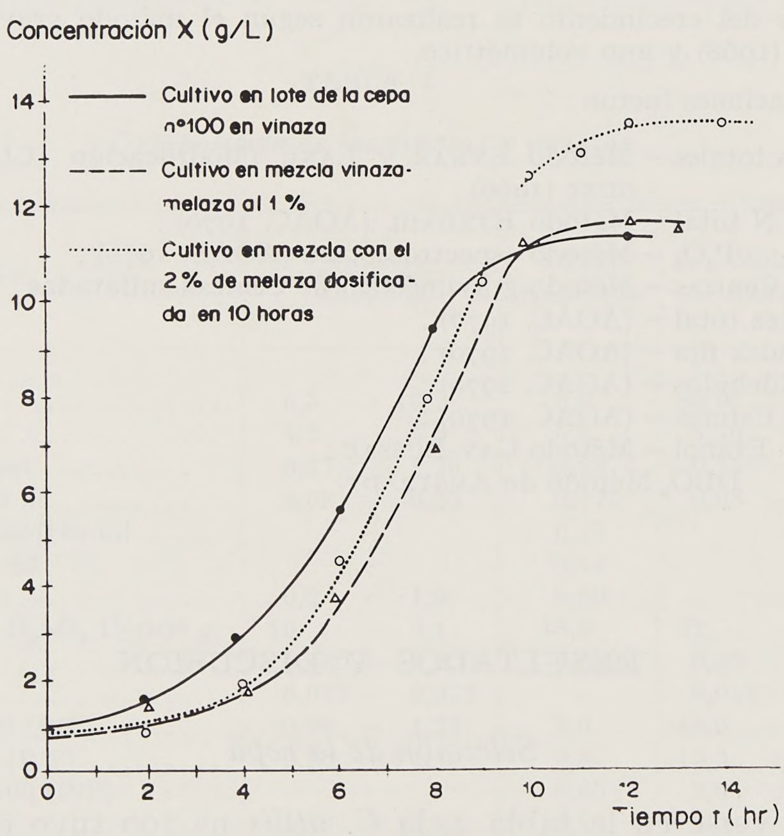



FIG. 1. — *Curvas de crecimiento*

*Cultivo continuo*

En la figura 2 se muestran las variaciones del rendimiento con la velocidad de dilución, teniendo el porciento de adición como parámetro. La forma de la curva para la vinaza pura coincide con lo encontrado por ALMAZÁN (1968). El ligero aumento de la parte media de las curvas restantes, corresponde con lo reportado por ŠILINGER y ALMAZÁN (1970).

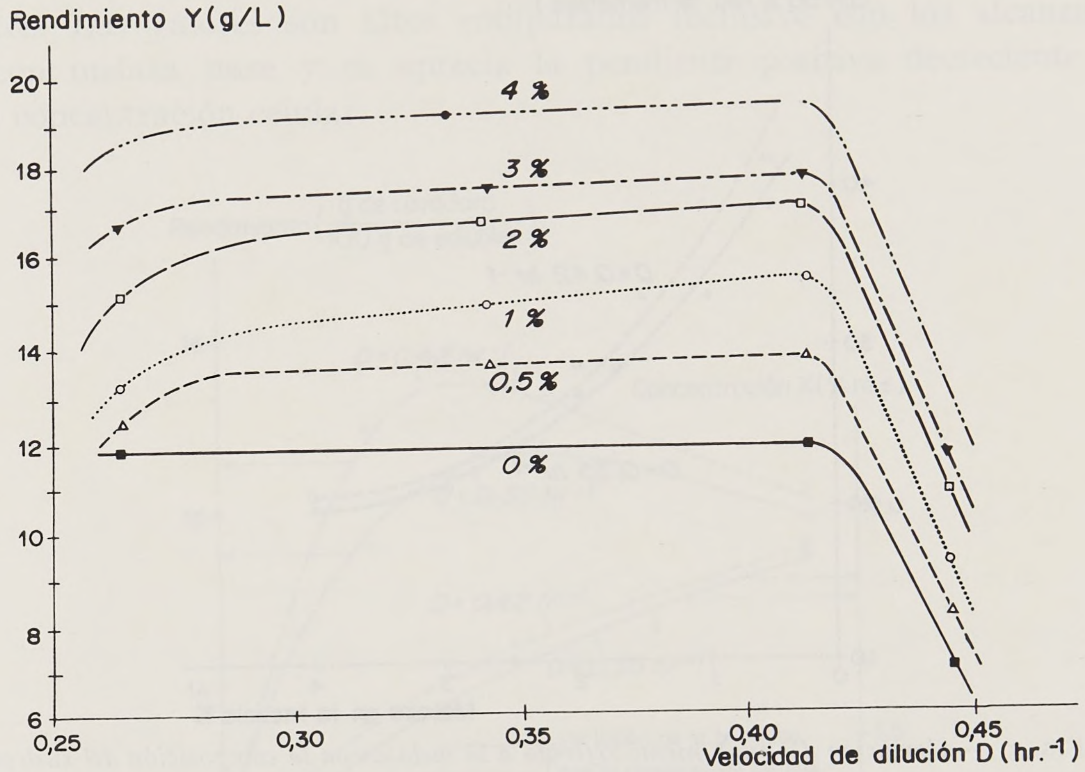



FIG. 2. — *Relación entre rendimiento y velocidad de dilución a diferentes concentraciones de melaza*

En la tabla 3 se aprecia claramente que las menores adiciones producen aumentos del rendimientos proporcionalmente más altos y una mejor utilización de la melaza añadida. El rendimiento referido a la melaza añadida, aspecto de gran importancia, se calculó sobre la base del rendimiento obtenido con la vinaza pura.

TABLA 3

*Analisis del rendimiento*

| Sustrato | Rendimiento maximo (g/L) | Aumentos referidos a la vinaza pura (p. 100) |
|---|---|---|
| Vinaza .................... | 11,8 | — |
| Mezcla (0,5 p. 100) ....... | 13,75 | 16,5 |
| Mezcla (1 p. 100) ......... | 15,4 | 30,5 |
| Mezcla (2 p. 100) ......... | 17,07 | 44,6 |
| Mezcla (3 p. 100) ......... | 17,55 | 48,5 |
| Mezcla (4 p. 100) ......... | 19,20 | 62,5 |

En la figura 3 se observa la pronunciada disminución de su valor con las adiciones en el intervalo de 0,5 a 2,0 p. 100. Para adiciones mayores, la curva parece acercarse asintóticamente a rendimientos comparables con los que se obtienen para la producción de levadura forrajera a partir de melaza pura (Dirección de Desarrollo industrial, 1974).

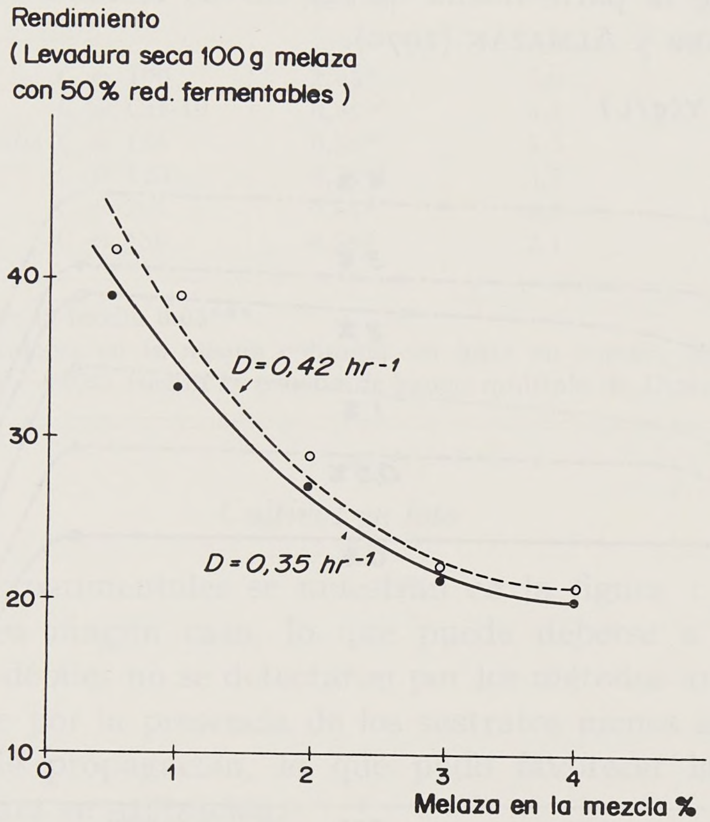



FIG. 3. — *Variación del rendimiento referido a la melaza con la composición del sustrato*

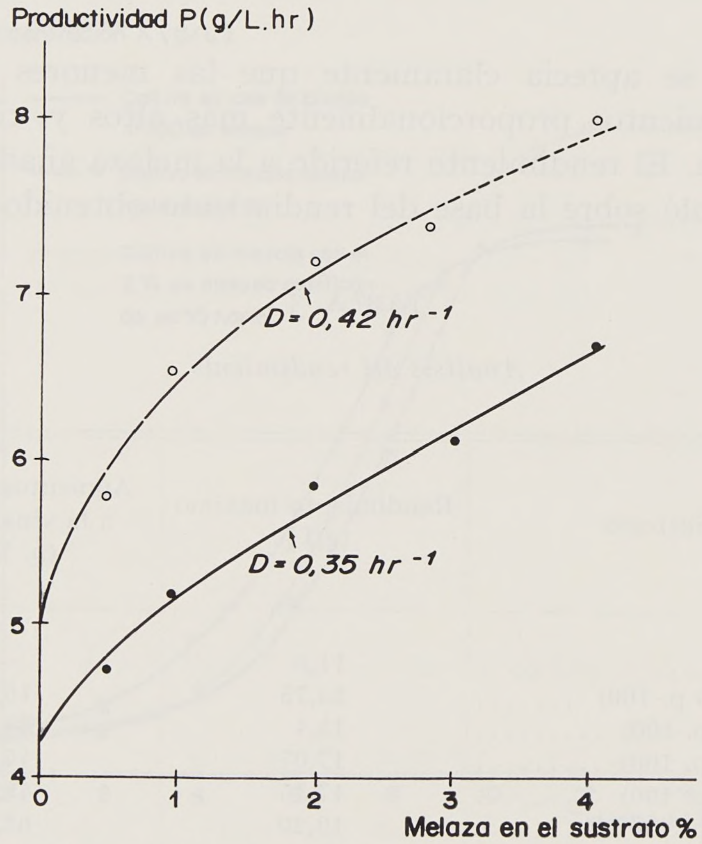



FIG. 4. — *Variación de la productividad con el sustrato a diferentes velocidades de dilución*

En la figura 5 se presentan los rendimientos sobre la base de los sólidos solubles en el sustrato.

En el caso de la vinaza pura, se alcanzan valores semejantes a los reportados por MALANOWSKA *et al.* (1968) con vinazas de remolacha y por ALMAZÁN (1968) con vinaza de caña. Se encontró la misma variación con respecto al nivel de adición, que en el gráfico del rendimiento referido a la melaza añadida (fig. 3). Por otra parte en la figura 4 se muestra el gráfico de la productividad contra la concentración de melaza en el sustrato para las velocidades de dilución más importantes. Los valores son altos comparados inclusive con los alcanzados en cultivos con melaza pura y se aprecia la pendiente positiva decreciente al aumentar la concentración celular.

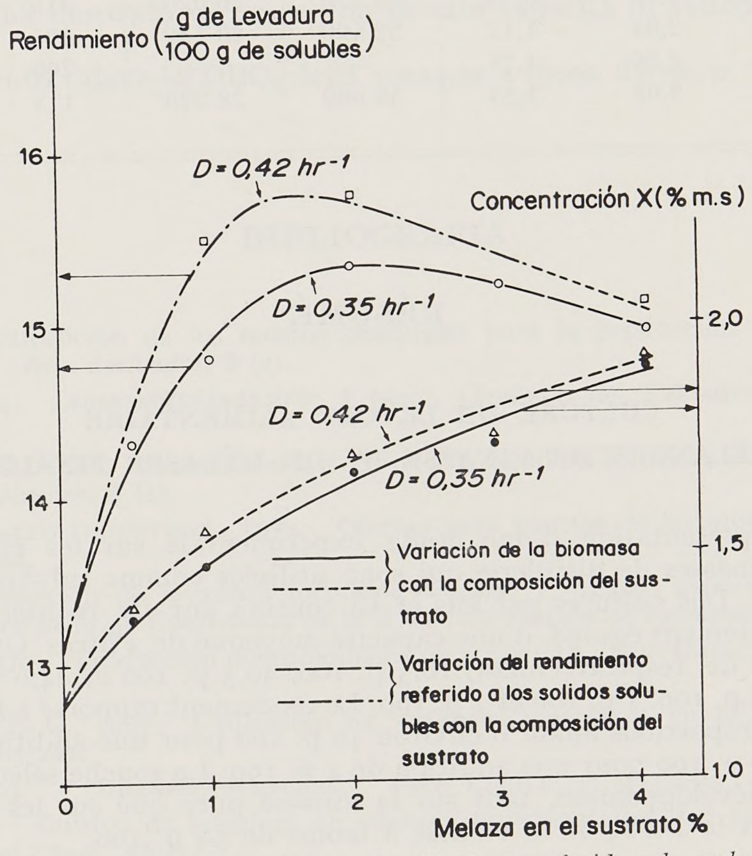



FIG. 5. — *Resultados experimentales : Rendimiento referido a la melaza añadida*

La reducción del 50 al 75 p. 100 en las sustancias reductoras (tabl. 4) puede considerarse alta.

La disminución de la $DBO_5$ fue cercana a lo reportado por STEZASKA y PERETA (1973) para la vinazas polonesas, pues llegó a menos del 50 p. 100, como se muestra en la tabla 4.

El consumo de nutrientes (tabl 4) se compara favorablemente con los datos de las plantas cubanas de levadura forrajera (GÓMEZ, 1970), y los requerimientos de ácido sulfúrico decrecen marcadamente con la adición de melaza.

Este trabajo se considera de interés para la industria, ya que contribuirá a tomar mejores decisiones técnico-económicas para las futuras plantas de levadura forrajera.

Se recomienda la realización de otro investigación similar, que estudie los effectos de la dilución del sustrato y un mayor intervalo de adiciones de melaza.

TABLA 4

*Resultados experimentales*

| Sustrato | Reductores totales (p. 100) | | $DBO_5$ | | Consumo de materias auxiliares (g/kg Lev. Seca) | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Sustrato | Efluente | Sustrato | Efluente | $H_2SO_4$ ($d$ = 1,84) | Urea Tecnica | Fosfato diamonico |
| Vinaza ............... | 1,0 | 0,20 | 44 770 | 18 800 | 250 | 222 | 99 |
| Mezcla (0,5 p. 100) ... | 1,26 | 0,64 | — | — | 336 | — | — |
| Mezcla (1 p. 100) ..... | 1,52 | 0,90 | 46 570 | 20 020 | 315 | 230 | 100 |
| Mezcla (2 p. 100) ..... | 2,04 | 1,12 | 52 400 | 23 580 | 226 | 224 | 120 |
| Mezcla (3 p. 100) ..... | 2,56 | 1,24 | — | — | 200 | 210 | 105 |
| Mezcla (4 p. 100) ..... | 3,08 | 1,84 | 59 000 | 28 320 | 114 | 204 | 90 |


## RÉSUMÉ

### CULTURE DE LEVURE ALIMENTAIRE SUR DES MÉLANGES DE VINASSE ET DE MÉLASSE FINALE DE CANNE

Il s'agit de la présentation d'une étude expérimentale sur les effets de l'addition de mélasse finale aux vinasses de distillerie qui sont utilisées comme substrat dans la production de levure alimentaire. Des cultures par lots et en continu ont été réalisées dans un fermenteur de laboratoire complètement équipé, d'une capacité moyenne de 3 litres. On a obtenu un accroissement de rendement de, respectivement, 16,5 p. 100, 30,5 p. 100 et 44,6 p. 100 pour une addition de mélasse de 0,5 p. 100, 1 p. 100 et 2 p. 100. Le rendement rapporté à la mélasse additionnée a diminué dans des proportions allant d'environ 40 p. 100 pour une addition de 0,5 p. 100 à des valeurs proches de 20 p. 100 pour une addition de 4 p. 100. La souche sélectionnée a montré une grande capacité de développement, tant sur la vinasse pure que sur les mélanges.

Ce procédé réduit la $DBO_5$ de la vinasse à moins de 50 p. 100.



## SUMMARY

### CULTURE OF FOOD YEAST ON MIXTURES OF SLOPS AND CANE FINAL MOLASSES

An experimental study of the effects obtained by adding final molasses to the distillation slops used as substrate for producing food yeasts is described here. Batch and continuous cultures have been performed in a laboratory fermentor completely fitted up of a mean 3 litres capacity. A yield increase of respectively 16,5 p. 100, 30,5 p. 100 and 44,6 p. 100 was obtained after an addition of 0,5 p. 100, 1 p. 100 and 2 p. 100 molasse. The yield related to the added molasse has decreased within limits reaching approximately 40 p. 100 for an addition of 0,5 p. 100 and 20 p. 100 for an addition of 4 p. 100. The selected strain has shown a high development capacity on pure slops as well as on mixtures.

This process reduces the $BOD_5$ of wash to less than 50 p. 100.

## RIASSUNTO


### COLTURA DI LIEVITO ALIMENTARE SU DEI MISCUGLI DI VINACCE E DI MELASSA FINALE DI CANNA

Trattasi di uno studio sperimentale sugli effetti dell'aggiunta di melassa finale alle vinacce di distilleria che sono impiegate come sostrato nella produzione di lievito alimentare. Sono realizzate delle colture in lotti e in continuo in un fermentatore da laboratorio completo, con una capacità media di 3 litri. L'aumento del rendimento è stato di 16,5 p. 100, 30,5 p. 100 e 44,6 p. 100 rispettivamente per un aggiunta di melassa di 0,5 p. 100, 1 p. 100 e 2 p. 100. Il rendimento, in rapporto alla melassa aggiunta, è diminuito in proporzioni che vanno dai 40 p. 100 per un' aggiunta di 0,5 p. 100 fino a dei valori vicini ai 20 p. 100 per un'aggiunta di 4 p. 100. La specie selezionata ha mostrato di avere una elevata capacità di sviluppo sia sulla vinaccia pura sia sui miscugli.

Questo procedimento riduce la $DBO_5$ della vinaccia a meno del 50 p. 100.


## BIBLIOGRAFIA


ALMAZÁN O., 1968. Utilización de los mostos residuales para la producción de levadura de forraje (Torula) I.C.I.D.C.A. *Rev. derivados,* **2** (2).

ANNEMÜLLER W., 1954. *Lebensmittelindustrie,* **1** (240). (Tomado del Zakladús Vyroky Kvasnicnych Bielkovin, V. GREGR.

BERAN K., ALMAZAN O., 1968. Fermentación contínua de levadura forrajera en mieles de caña cubana. I.C.I.D.C.A. *Rev. derivados,* **2** (1).

DIRECCIÓN DE DESARROLLO INDUSTRIAL, 1974. Ofertas para plantas de levadura forrajera a partir de melazas finales de caña.

GÓMEZ R., 1970. Producción de levadura forrajera (*Torula*) y algunos aspectos técnicos-económicos de la misma. *Resumen de la* 39 *Conferencia de la A.T.A.C. Sección de Fermentaciones.*

GONSALVES DE LIMA, 1970. Producción microbiológica de proteinas. *Rev. Quim. Ind.,* **33** (387). (Tomado del *Chem. Abstr.*).

HARTE M. J., WEBB F. C., 1967. Utilización de azúcares mezclados en la fermentación contínua. *Biotech. Bioeng.,* **9**, 205-221.

LUCDEKING, PIRET, 1959. *J. Biochem. Microbiol.* Fech Enging (1), 431-459.

MALANOWSKA J., 1968. Cultivo de levadura en vinazas suplementadas con melazas. *Inst. Spozejev* **17** (3), 27 (Tomado del *Chem. Abstr.*).

PERKOMCHUK M. A., ZOBRODSKI A. G., PERERVO P. K., SEMENETS P. A., KOVALENKO A. D., 1971. Cultivo experimental de levadura forrajera en vinazas de destilería. *Inst. Likoro-Vedech Prem.* (12), 74.

SILINGER V., ALMAZÁN O., 1970. Producción de biomasa a partir de mezclas mosto-miel. *Resumen de la* 39 *Conf. de la A.T.A.C. Sección de Fermentaciones* (*Derivados*).

STORZASKA J., PERETA W., 1973. Comunicación personal.

*Ann. Technol. agric.*, 1975, **24** (3-4), 297-305.

# TECNICAS USADAS, EN BARRILES DE ROBLES, PARA DISMINUIR MERMAS Y RECUPERACION DE LOS MISMOS

DIEGO VARGAS GUZMAN

*Compania de Licorera de Nicaragua, S. A., Chichigalpa (Nicaragua, C. A.)*


## RESUMEN

El envejecimiento de los aguardientes en barriles de Robles, es algo muy necesario y parte esencial del proceso de manufactura, siendo sin duda el factor principal que constituye el desarrollo de la calidad del producto.

El presente estudio se realizó para concretar como logramos minimizar costos mediante reducción de mermas, durante el período de envejecimiento ; y como optimizamos nuestros costos de envejecimiento, al lograr recuperar barriles de Robles en mal estado.

Un lugar de trabajo apropiado, para nuestros barrileros, era de primordial importancia : por lo que construímos lo que denominamos « Area Techada de Barriles » dicha área nos proporciona, al mismo tiempo, un flujo de trabajo sincronizado, en la reparación de barriles.

Como información complementaria proporcionaremos generalidades sobre bodega de almacenamiento de barriles, factores transcendentales durante el envejecimiento y cambios fisicoquimicos que se llevan a cabo durante el anejamiento.


## I. — INTRODUCCION

El envejecimiento de los aguardientes en barriles de Robles, es algo muy necesario y parte esencial del proceso de manufactura, siendo sin duda el factor principal que constituye al desarrollo de la calidad del producto.

El presente estudio se realizó para concretar como logramos minimizar costos mediante reducción de mermas durante el período de envejecimiento ; y como optimizamos nuestros costos de envajecimiento, al lograr recuperar barriles de Robles en mal estado.

Un lugar de trabajo apropiado para nuestros barrileros era de primordial importancia : por lo que construímos lo que denominamos « Area Techada de Bar-

riles », dicha área nos proporciona al mismo tiempo, un flujo de trabajo sincronizado, en la reparación de barriles.

Como información complementaria proporcionaremos generalidades sobre bodega de almacenamiento de barriles, factores transcendentales durante el envejecimiento y cambios fisicoquímicos que se llevan a cabo durante el añejamiento.

## II. — GENERALIDADES

Los toneles se originaron hace más de 2,000 años y conllevan principios ortodoxos de ingeniería. Las duelas son arqueados en dos direcciones, formando la ideal figura para máxima potencia.

Su forma comba hace más fácil su rodamiento y permite pararlo convenientemente. Sus terminales planos proveen un almacenamiento estable, sus flajes pueden ser trabajados hacia las partes combas para mantener las duelas juntas y hacer el barril o tonel a prueba de goteos, al mismo tiempo cerrando el cabezal dentro de las ranuras para su almacenamiento.

Un barril es como un contenedor en ruedas. Puede ser rodado fácilmente por un hombre y debido a su barriga rebota rápidamente y puede manejarse en cualquier dirección. Su levantamiento se efectúa mecienda su barriga hacia atras y adelante y su ritmo provee un mansjo conveniente dando al final un levantamiento para poner el barril en su lugar.

Manejo y almacenamiento : Un tonel no debe ser movido o rodado por sus cantos o jables, deberá ser rodado únicamente por su centro (barriga) o lados. Toneles flojos deberán ser guardados sobre su base, y barriles compactos sobre su barriga con el tapón hacia arriba.

## III. — BODEGAS

La ventilación en la bodega, es necesaria para mantener un ambiente de olor agradable, libre de exceso de humedad y de hongos. En cuanto al aspecto de ventilación, sería bueno señalar que también la buena ventilación contribuye a mantener condiciones ambientales más uniformes dentro de las bodegas, de suerte que todos los barriles esten, hasta donde sea posible, puestos a las mismas condiciones de temperatura, humeded concentración de oxígeno, concentración de vapores alcoholicos y presión parcial de todos los componentes alrededor de cada barril.

Sinembargo deberá haber flujo de aire en el ambiente, para permitir así los cambios de oxidación, convirtiendo alcoholes en aldehídos y aldehídos en ácidos. Los ácidos reaccionan con alcoholes para formar ésteres que es el componente que más contribuye al aroma y sabor agradable del producto. Sinembargo un exceso en ventilación ocasionaría mayores pérdidas por evaporación.

Los techos de las bodegas deben ser construídos de algún material que no cause una radiación de calor excesiva hacia los barriles, que estan en la parte superior, para evitar que éstos sean sobrecalentados y se aumente considerablemente más las mermas en éstos que en los otros barriles. De lo contrario sería conveniente mantener

algún sistema de ventilación forzada, especialmente si los techos de las bodegas fueran de zinc. También en este caso es bueno aumentar la distancia entre el techo y la hilera más alta de barriles en los almacenes.

## VENTAJAS DEL ALMANAMIENTO EN PALETAS *vs.* EL ALMACENAMIENTO EN POLINES

*a*) El espacio en bodegas es mejor aprovechado.

*b*) El manejo de barriles, por medio de un montacargas, es más práctico.

*c*) El personal humano necesario es menor.

*d*) El barril se deteriora menos durante su manejo.

*e*) La operación se lleva a cabo en una forma más eficiente, ya que lotes y tipos de barril pueden ser localizados y seleccionados más fácilmente.

*f*) Se recomienda que el montacarga sea eléctrico para evitar contaminación del ron embarrilado ; o montacarga que operen a base de quemar gases licuados de butano y propano.

Quisieramos hacer mención que algunos fabricantes (en los sitios que han conseguido que las leyes y reglamentos que aplican al almacenamiento de rones para envejecimiento sean enmendados) estan probando, aparentemente con éxito, el almacenaje de los barriles en polines, pero sin mover los barriles sino más bien moviendo el ron, vaciando y llenando los barriles en su sitio. Esto se ha hecho con bombas en donde la succión se conecta con mangueras flexibles a une serie de entrades en paralelo, para que un número de barriles puedan ser vaciados simultáneamente.

## IV. — RECUPERACION DE BARRILES Y TAPAS

### *Recuperacion de barriles*

Barriles de quince años que se encuentran en malas condiciones se podrán restaurar recuperando las duelas en buen estado. Aquellos barriles que no admiten reperación se recuperarán tapas, aros y duelas en buen estado. Una vez que se obtengan suficientes duelas seleccionadas se procedará al armado del barril de la siguiente forma :

*a*) Se debará colocar las duelas contra los dos primeros aros, hasta que se llegue a obtener la forma del barril. Si alguna duela no tuviera la juntura correcta, proceder a rectificarla mediante la cepilladora eléctrica.

*b*) Se pondrá el tercer aro y se nivelarán las duelas golpeando simultáneamente con un martillo por fuera y por dentro del barril.

*c*) Emparejar las puntas de las duelas con el cepillo curvo para proceder luego a usar la sierra eléctrica que se encargara de rectificar los canales de las duelas. Dicha rectificación hará que las tapas asienten perfectamente, eliminando así fugas parciales.

*d*) Si ambos canales están niveledos, procédase a colocar las tapas.

*e*) Poner tule, si las puntas de las duelas están abiertas, pare evitar filtraciones.

*f*) Una vez que el barril está armado, pasar a la ensunchadora : ésta es una especie de prensa encargada de presionar los aros proporcionando un mejor contacto entre duelas.

*g*) Aros :

La maquina ensunchadora colocará a presión los aros en los barriles, pero no los dejará en la posición correcta, si ellos no tienen el diámetro apropiado. Es por eso que el barrilero deberá de saber como hacer un aro a la medida :

1) El aro boquero : quedará a nivel con las puntas de las duelas.
2) El segundo aro boquero quedara a 2″ distante del primer aro, una vez que la ensunchadora halla ejercido presión sobre éste.
3) El aro pancero quedará distante a un tercio del largo total de la duela.

### *Recuperacion de tapas*

*a*) Con el fin de corregir las tapas combas, procedimos a fabricar una prensa de vapor. Básicamente hablando, la prensa es un cajón de hierro el cual tiene en el fondo une cruceta de tubos agujereados por donde circula el vapor. Por la parte superior unos tornillos presionan las tapas forzándolas a tomar su forma plana. En dichas prensas las tapas permanecen durante ocho horas. Resocados periódicos son necesario para ejercer presión sobre la tapa, a medida que la curvatura va cediendo.

*b*) Una vez que la tapa ha pasado por la prensa de vapor, se procederá a rectificar las junturas de los componentes de las tapas.

*c*) Un taladro se encargará de corregir los agujeros, en las junturas de las tapas, para luego introducir las aspigas que deberán de mantener las piezas juntas.

*d*) Une sierra de banda es usada para cortar en circunferencia, el tamaño necesario de tapa. Si fuera preciso se podría tomar cualquier pieza faltante marcando el tamaño requerido con un compás y dejando media pulgada sobrante de la circunferencia ; este sobrante servirá para hacer el corte circular y corte lateral.

*e*) Después de haber realizado el corte con la sierra de banda, la tapa se deberá colocar con la cara hacia abajo en la mesa de la máquina encargada de hacer los cortes laterales. Se comenzará cortando a partir de la pieza más próxima al centro y en las piezas esquineras se hará un corte con mayor suavidad. Las cuchillas de las máquinas son ajustables, al igual que las piezas, lo que facilitará el trabajo antes mencionado. Al momento de hacer los cortes, la rotación de las tapas deberá ser en dirección de las manacillas del reloj.

Duelas para tapas de 23″ de largo y un grosor de 4″ deberán comprarse, para complementar al máximo las piezas faltantes, de segunda mano.

## V. — AREA TECHADA DE BARRILES (fig. 1)

El area techada la sub-dividimos en ocho sub-áreas necesarias para la reparación prueba y llenado de los barriles. El criterio usado fue el siguiente ;

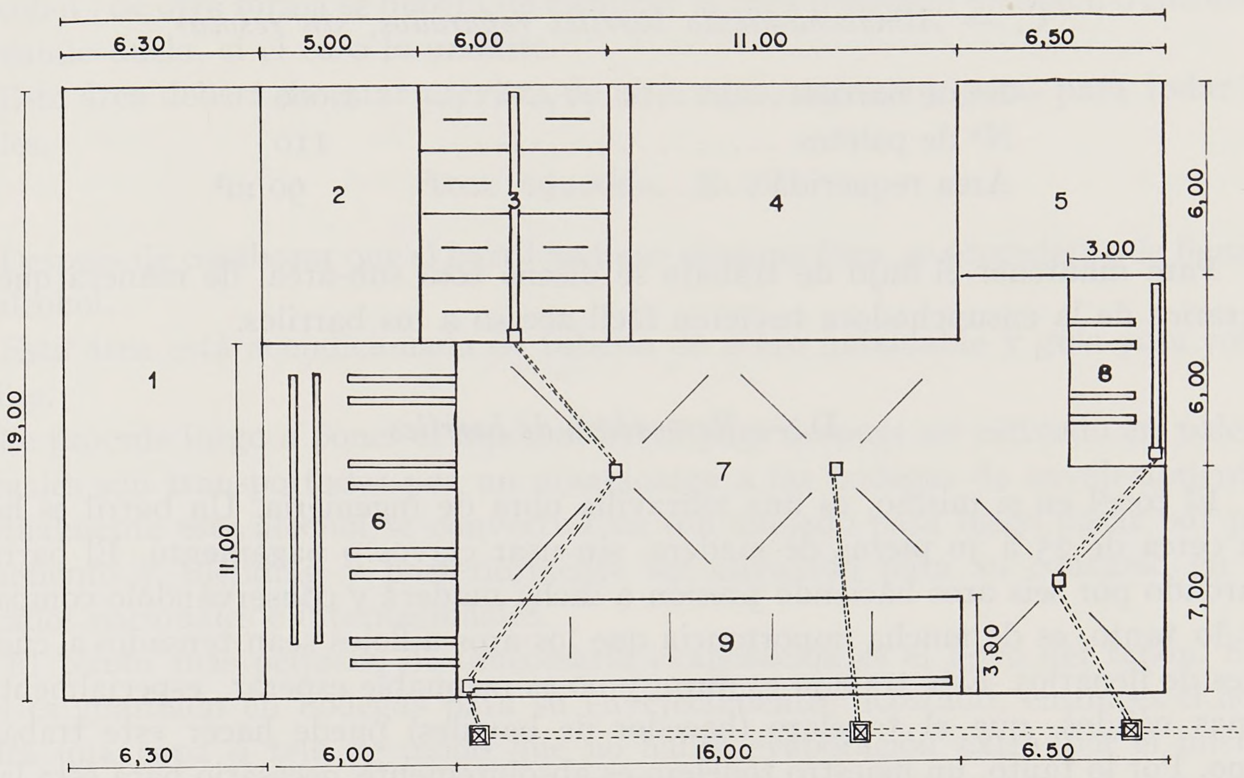



FIG. 1. — *Plano de distribución procesamiento de barriles*

1. Almacenamiento de barriles sin reparar
2. Barriles in proceso de reparacion
3. Area para reparar barriles
4. Almacenamiento barriles reparados sin resocar
5. Resocadora de barriles
6. Llenado de barriles
7. Llenado de agua barriles
8. Vaporeo de barriles
9. Prueba de barriles

A. — *Almacenamiento de barriles a ser reparados*

| | |
|---|---|
| Nº de barriles .................... | 1,500 |
| Nº de paletas necesarias ........... | 166 |
| Area requerida .................... | 120 $m^2$ |

Con esta área hemos logrado evitar el efecto destructivo del sol y del agua al igual que preservar al barril del peligroso insecto perforador.

B. — *Area de reparación de barriles*

| | |
|---|---|
| Nº de barrileros .................... | 10 |
| Area necesaria por barrilero........ | 6 $m^2$ |
| Area total requerida ............... | 60 $m^2$ |

Esta área suministra una atmósfera agradable para el trabajador redundando en un aumento de eficiencia del barrilero. Esta área está dotada de : Agua, vapor, energía eléctrica 110 volt. y 210 volt.

### C. — *Almacenamiento barriles reparados, sin resocar*

| | |
|---|---|
| Nº de barriles | 1,000 |
| Nº de paletas | 110 |
| Area requerida | 90 m² |

Para mantener el flujo de trabajo se diseñó ésta sub-área, de manera que los operarios de la ensunchadora tuvieren fácil acceso a los barriles.

### D. — *Resocadora de barriles*

El tonel en si mismo, es una maravilla obra de ingeniería. Un barril es hecho con cerca de 25 a 30 piezas de madera, sin usar clavos o pagamento. El barril es guardado por seis aros haciendo presión a dicha madera y conservándolo compacto, por lo tanto, es de mucha importancia que los aros a flejes sean tensados al cuerpo, antes de llenarlos. Este trabajo es duro, y no es razonable esperar, especialmente en clímas cálidos, que el tonelaro (hacedor de barriles) puede hacer este trabajo a mano. Por lo tanto, un maestro tonelero es absolutemente necesario para esta labor. El maestro deberá ver que las duelas sean bien ajustadas para así evitar la evaporación por dichas juntas. Ninguna destilería deberá estar sin una ensunchadora (Hoop Driver) en estos días, cuando la melaza o miel en su valor fijo son altos, y cuando no se desea evaporación. La ensunchadoro (Hoop Driver) es una máquina pesada que durará muchos años. Una nueva máquina hidráulica que representa una inversión de algo como US $ 20,000 y que durará por muchos años, permitirá a un hombre sellar muchos cienes de barriles en un día.

Area necesaria 40 m²

Otros requisitos de los que deberá estar dotada ésta área es corriente eléctrica 210 volt. y 440 volt.

### E. — *Area para el llenado de aqua de barriles*

El barril se llena con agua para que las duelas lleguen a expandirse, obteniendo así un mejor contacto entre ellas y que la absorción ocasionada por el barril reseco sea reducida. Después de tres días se procede a vaciar el barril. Esta área deberá estar diseñada con pendientes de 2 p. 100 a los drenajes.

| | |
|---|---|
| Nº de barriles | 300 |
| Area barril | 0.6 m² |
| Area total requerida | 200 m² |

*Prueba de barriles.*

Una vez que el barril ha permenecido con agua por espacio de tres días pasa a la prueba final. Dicha prueba consiste en someter el barril a una presión de aire de cinco libras/pulgs.² e inspeccionar minuciosamente el barril. De no haber caída de presión, es señal de que el barril ha sido reparado correctamente y se procederé al llenado

de alcohol ; de otra forma se deberá de localizar la fuga poniendo un Spich o inclusive cambiando duela, si el caso lo amerita.

Esta área deberá de estar prevista de aire, agua, drenaje y guías para rodar los barriles.

Area requerida : 50 m²

Después de coraborar que el barril no tiene ninguna fuga, se procederá a la llenada con alcohol.

Esta área está acondicionada de tubería de acero inoxidable y guía para rodar barriles.

Se procede luego a poner el tapón al barril para después ser estivado en paletas las cuales son transportadas por un montacarga a las bodegas de envejecimiento ; eventualmente este alcohol se convertirá en ron añejado para luego pasar por pretratamiento y Blending y posteriormente ser envasado para su consumo en los mercados nacionales e internacionales.

El punto más pequeño de innecesaria evaporación es el hoyo del tapón. Si el tonel es guardado en bodegas para su envejecimiento, acostado, entonces el hoyo tendra una capa o tela de modo que no habra evaporación extra por el mismo. Si el almacenamiento se hace en forma paletizada y los toneles son colocados parados, entonces, por supuesto, el ron presionará siempre el hoyo del tapón y no será de buena ideá usar trapo, que en este caso actuaría como la mecha de una candela y pasaría el ron hacia el exterior. Si no se usa tela, es importante observar que el tapón se ajuste al hoyo debidamente. Un tapón especial está ahora manufacturándose para uso en bodegas que almacenan por sistema palatizado, el cual es de 1-1/4″ de largo. El tapón normal es de 7/8″ de grosor, pero las duelas del tonel son de una pulgado de grosor, lo que significa que el tapón realmente no llena al hoyo del tapón. El nuevo tapón de 1/1/4″ llenará el cupo del hoyo, naturalmente.

## VI. — FACTORES TRANSCENDENTALES DURANTE EL ENVEJECIMIENTO

La calidad de los rones que se obtengan, dependerán de la calidad inicial del aguardiente ; del tipo y tamaño del envase, de las condiciones ambientales prevalecientes durante el añejamiento, y del tipo de añejamiento. Sobre la calidad inicial del añejamiento hay evidencias concluyentes de que conviene la presencia de cierta cantidad de congenéricos para que exista la oportunidad de que comienze a ocurrir las series de reacciones químicas que determinan el progreso de madurez del ron. El término madurar : define la serie de cambios favorables que paulatinamente van eliminando tufos y asperezas, en los aguardientes, y desarrolando sabor y olor agradable.

Para que ocurra la esterificación, se necesita la presencia de ácidos y alcoholes superiores además del etilico; para que ocurra la polimerización y condensación se necesitan los aldehídos. Para que existan nuevos ácidos y alcoholes se necesitan los ésteres.

Durante el envejecimiento la acidez de los rones aumenta rápidemente alcan-

zando valores de diez veces el valor inicial en los primeros dos años. Los ésteres, en el primer año, solamente alcanzan aproximadamente una tercera parte del aumento que se observa en la acidez, pero en el segundo año aumenta mucho y se equipara con los ácidos sobrepasando luego a éstos. Los alcoholes superiores sólo aumentan de 15 à 20 p. 100 más del valor inicial durante el período de envejecimiento de 6 años. Los aldehídos aumentan lentamente llegando aproximadamente dos veces su valor inical en 6 años.

*Tiempo de envejecimiento*

Un mínimo de dos años y un máximo de cinco años, para todos los rones es permitido. La experiencia demuestra que el tiempo óptimo de añejamiento es de cinco años pero un tiempo de añejamiento que fluctúa entre dos y 3-1/2 años será adecuado, sin que la calidad se perjudique y resultara en una operación más económica.

Las mermas usuales del ron por evaporación durante el añejamiento son aproximadamente :

| | |
|---|---|
| Primer año ................ | 14 p. 100 |
| Segundo año .............. | 6 p. 100 |
| Tercer año ................ | 5 p. 100 |
| Cuarto año ............... | 4 p. 100 |

*Tipo de barril*

Se recomienda para añejamiento « Tipo Standar » el barril de roble quemado con capacidad de 189 litros.

El envejecimiento en barriles quemados es definitavemente superior al uso de barriles sin quemar.

Los barriles nuevos son superiores para añejar rones pero, después de año y medio estos deberán ser trasegados a barriles usados, por que de la contrario al ron se pone muy amargo.

La calidad de madera con que se confeccione el barril, tamaño de los barriles, el tiempo de envejecimiento, la temperatura que exista en los almacenes de envejecimiento, el nivel de ventilación que existe en los almacenes y la distancia entre barriles, todos son factores que afecta el sabor y olor del producto final.

## VII. — CONCLUSION

Los altos precios de los barriles de robles, producto de la inflacción mundial-aunado a incrementos en la industria vinícola y una baja en el consumo de Bourbon Whiskey, lo cual redunda en una caída en el suministro de barriles reusados ; conjunto con los altos precios a que se cotiza la miel en los mercados internacionales, llegamos al convencimiento que debemos hacer uso, al máximo, de nuestros recursos para recuperar barriles y fijar nuestra atención en las mermas durante el proceso de envejecimiento.

Esperamos que este pequeño estudio oriente y despierte inquietudes en las industrias roneras, para recuperar barriles en mal estado y minimizar costo mediante reducción de mermas, producto de buen armado de barriles. La inversión es rentable.


## RÉSUMÉ

### TECHNIQUES UTILISÉES, EN FUTS DE CHÊNE, POUR DIMINUER LES PERTES PAR ÉVAPORATION ET POUR RÉCUPÉRATION DES FUTS

Le vieillissement des eaux-de-vie en fûts de chêne est nécessaire et constitue la phase essentielle de leur élaboration ; il est sans aucun doute le facteur principal qui détermine le développement de la qualité du produit.

La présente étude a été réalisée pour montrer comment nous sommes parvenus à diminuer les frais par la réduction des pertes par évaporation pendant la période de vieillissement, et comment nous avons optimisé nos coûts de vieillissement par récupération des fûts de chêne en mauvais état.

Un lieu de travail approprié pour les tonneliers est d'importance capitale ; nous avons donc construit une « aire couverte de fûts » qui procure en même temps un flux de travail synchronisé dans la réparation des fûts.

Nous donnons également quelques généralités sur l'entreposage des fûts et les modifications physico-chimiques qui se produisent au cours du vieillissement.



## SUMMARY

### TECHNIQUES USED TO REDUCE EVAPORATION LOSSES AND RECLAIM CASKS IN THE CASE OF OAK-CASKS

The ageing of brandies in oak-casks is necessary and constitutes the main stage of their production : it is certainly the factor which determines most the evolution of the quality of the product.

This study aimed at showing how we succeeded in reducing the costs through a diminution of evaporation losses during ageing and how we optimalized the ageing costs in reclaiming the defective oak-casks.

An adequate work place is essential for the wet coopers ; we therefore built a covered area for the casks which at the same time allows a synchronized work in repairing the casks.

There follow some generalities concerning the storage of casks and the physico-chemical modifications observed during ageing.



## RIASSUNTO

### TECHNICHE ADOTTATE PER DIMINUIRE L'EVAPORAZIONE NELLE BOTTI DI QUERCIA E PER RICUPERARE TALI BOTTI

L'invecchiamento delle acquaviti in botti di quercia è necessario e costituisce la fase essenziale della loro elaborazione. Esso è senza alcun dubbio il fattore principale che determina lo sviluppo della qualità del prodotto.

Questo studio è stato effettuato per mostrare come siamo arrivati a diminuire le spese grazie alla riduzione dell'evaporazione durante il periodo d'invecchiamento e come abbiamo ridotto al massimo i nostri costi d'invecchiamento ricuperando delle botti di quercia in cattivo stato.

Un fattore di primordiale importanza è anzitutto che i bottai dispongano di un posto di lavoro appropriato ; abbiamo dunque costruito una « zona coperta di botti » che permette di avere nello stesso tempo un lavoro sincronizzato per la riparazione delle botti.

Vengono presentati egualmente alcuni elementi di carattere generale sullo stoccaggio delle botti e sulle trasformazioni fisico-chimique che hanno luogo durante l'invecchiamento.

*Ann. Technol. agric.*, 1975, **24** (3-4), 307-315.

# ÉTUDE QUALITATIVE ET QUANTITATIVE DES CONSTITUANTS VOLATILS DU RHUM

P. DUBOIS et J. RIGAUD

*Station de Technologie des Produits végétaux,*
*7, rue Sully,*
*21034 Dijon Cedex*

## RÉSUMÉ

Les alcools secondaires et les phénols volatils ont été étudiés dans le rhum par chromatographie en phase gazeuse et spectrométrie de masse.

L'utilisation d'un diviseur de débit placé en sortie de colonne de chromatographie a permis de sentir les composés élués pour divers extraits de rhum, et de détecter des composés caractéristiques qui ont été identifiés par CPV-SM à la β-damascénone *trans* et à l'un de ses isomères.

On propose une méthode simple pour la préparation d'extraits caractéristiques et concentrés pour l'analyse en CPV.

Les principaux constituants volatils des eaux-de-vie sont des dérivés aliphatiques : alcools, aldéhydes, acides, esters et acétals, qui proviennent du métabolisme microbien des acides α-cétoniques et des lipides. La distillation et le vieillissement modifient les concentrations relatives de ces divers constituants, et apportent d'autres composés tels que dérivés du furane et phénols volatils. A cet égard, le rhum a une composition très semblable à celle des autres eaux-de-vie, d'autant que le jus de canne et la mélasse ne semblent pas posséder de composés particuliers (YOKOTA et FAGERSON, 1971). Nous avons donc recherché s'il était possible de repérer des constituants caractéristiques au sein d'autres catégories de substances, et notamment parmi les alcools secondaires et les phénols. Par ailleurs, notre travail a porté sur l'identification d'un constituant très caractéristique des rhums, en nous inspirant des travaux effectués au début de ce siècle par MICKO (1908). Enfin, nous avons fait des essais d'extractions sélectives en vue de la mise au point de techniques quantitatives d'analyse.

## 1. — ALCOOLS SECONDAIRES

Le butanol secondaire est toujours plus abondant dans les rhums que dans les whiskies (SUOMALAINEN et NYKANEN, 1970) ; il semble en être de même pour le *n*-pentanol-2 (LIEBICH *et al.*, 1970) et pour le *n*-heptanol-2 (ALLAN, 1973).

Nous avons retrouvé ces composés en quantités importantes dans certains rhums, en même temps qu'un autre alcool secondaire, le *n*-heptén-1 ol-3. L'origine de ces composés est mal connue, mais on peut penser que des méthyl carbinols à nombre impair d'atomes de carbone sont susceptibles de se former par des voies semblables à celles qui mènent à la formation, par les moisissures, des méthyl-cétones de certains fromages (DAY, 1967).

Quoi qu'il en soit, ces composés ne semblent pas présenter de propriétés odorantes particulières.

## 2. — PHÉNOLS VOLATILS

Les phénols simples identifiés dans les eaux-de-vie sont indiqués sur le tableau 1 où ils sont classés en fonction de leurs structures (fig. 1).

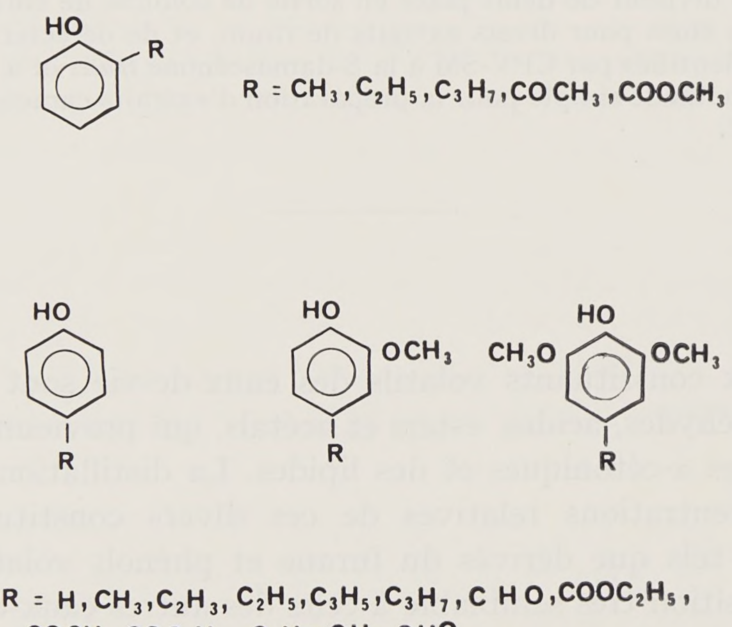



FIG. 1. — *Structures des phénols volatils des eaux-de-vie*

Dans les huiles de fusel du whisky, BRAUS et MILLER (1958) ont identifié des traces de phénol et d'*ortho*-crésol ainsi que des quantités plus appréciables de gaïacol, de méthyl-4 gaïacol et d'éthyl-4 gaïacol. Dans les rhums blancs, DUBOIS *et al.* (1972) ont identifié le gaïacol, l'éthyl-4 phénol, l'éthyl-4 gaïacol, le vinyl-4 gaïacol et le propyl-4 gaïacol. Plus récemment, nous avons trouvé dans des rhums grand arôme,

des quantités semble-t-il très importantes d'éthyl-4 gaïacol, de propyl-4 gaïacol et de salicylate de méthyle. On peut penser que ces composés se forment au cours de la fermentation alcoolique comme l'ont montré STEINKE et PAULSON (1964).

Tous les autres phénols semblent provenir uniquement de la lente dégradation de la lignine des bois de fût.

Ces phénols volatils participent certainement de façon très significative à l'arôme du rhum, mais il semble peu probable qu'ils puissent apporter la note caractéristique qui permet de distinguer un rhum d'un autre alcool lors de dégustations.

TABLEAU I

*Phénols volatils des eaux-de-vie*

| | Rhum | Whisky | Cognac |
|---|---|---|---|
| Phénol | 4-7-10 | 2-9-11 | — |
| Méthyl-4 phénol | 4-10 | 9 | — |
| Éthyl-4 phénol | 4-7-10 | 6-9 | — |
| Hydroxy-4 benzaldéhyde | — | — | 5 |
| Gaïacol | 4-7-10 | 2-9 | — |
| Méthyl-4 gaïacol | 4-7-8-10 | 2-9 | — |
| Vinyl-4 gaïacol | 4 | — | — |
| Éthyl-4 gaïacol | 4-7-10 | 2-9 | — |
| Eugénol | 4-7-8-10 | 9 | — |
| Isoeugénol | 4-7 | — | — |
| Propyl-4 gaïacol | 4-10 | — | — |
| Vanilline | 4-7 | 1-2-6 | 3-5 |
| Vanillate d'éthyle | 4-7 | — | — |
| Acétovanillone | 4 | — | — |
| Propiovanillone | 4 | — | — |
| Coniféraldéhyde | 4 | 1 | 3-5 |
| Diméthyl-2,6 phénol | 4 | — | — |
| Éthyl-4 diméthoxy-2,6 phénol | 4 | — | — |
| Vinyl-4 diméthoxy-2,6 phénol | 4 | — | — |
| Syringaldéhyde | 4 | 1 | 3-5 |
| Syringate d'éthyle | 4 | — | — |
| Acétosyringone | 4 | — | — |
| Propiosyringone | 4 | — | — |
| Sinapaldéhyde | 4 | 1 | 3-5 |
| Méthyl-2 phénol | 10 | 2-9 | — |
| Éthyl-2 phénol | — | 9 | — |
| Isopropyl-2 phénol | — | 9 | — |
| Hydroxy-2 acétophénone | 7 | 9 | — |
| Salicylate de méthyle | 7 | — | — |
| Diméthyl-2,6 phénol | — | 9 | — |
| Tétraméthyl phénol | — | 6 | — |
| Méthyl-6 gaïacol | — | 9 | — |
| Hydroxy-2 méthyl-5 acétophénone | — | 9 | — |
| Scopolétine | — | 1 | 3-5 |

(1) BALDWIN *et al.*, 1967 ;
(2) BRAUS et MILLER, 1958 ;
(3) BRICOUT, 1971 ;
(4) DUBOIS *et al.*, 1972 ;
(5) JOSEPH et MARCHE, 1972 ;
(6) KAHN *et al.*, 1969 ;
(7) LIEBICH *et al.*, 1970 ;
(8) MAARSE et ten Noever de BRAUW, 1966 ;
(9) NISHIMURA et MASUDA, 1971 ;
(10) TIMMER *et al.*, 1971.

## 3. — CONSTITUANT CARACTÉRISTIQUE DU RHUM

Lors d'analyses d'extraits de rhum par chromatographie en phase gazeuse, nous avons repéré olfactivement un composé qui semble être très caractéristique de l'arôme du rhum. Cette détection s'est effectuée grâce à l'emploi d'un diviseur de débit placé en sortie de colonne de chromatographie en phase gazeuse (fig. 2). Une partie du gaz vecteur va vers un détecteur physique, ce qui permet d'obtenir un chromatogramme ; l'autre partie du gaz est dirigée hors du chromatographe, ce qui permet à l'opérateur de sentir les composés élués.

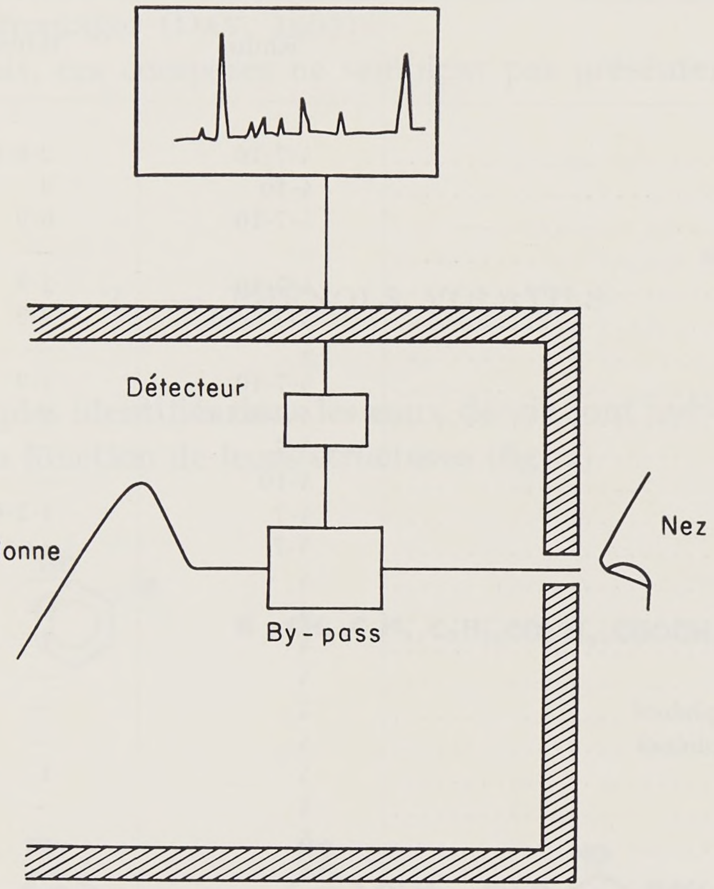



FIG. 2. — *Analyse olfactive des effluents d'un chromatographe en phase gazeuse*

Sur la fraction neutre d'un extrait de rhum, et sur phase liquide siliconée (OV 225), nous avons obtenu un chromatogramme dont la partie qui nous intéresse fait l'objet de la figure 3. Les principaux pics correspondent, dans l'ordre, au *n*-octanol-1, à l'octanoate d'éthyle, au menthol, au décanoate d'éthyle, au phényl-2 éthanol-1 et à son acétate, au dodécanoate d'éthyle. Au début de l'élution du pic A, l'odeur perçue est très caractéristique du rhum, puis elle change et évolue vers celle du laurier sauce ou du genièvre. La spectrométrie de masse montre que le pic A est essentiellement dû à la β-damascénone *trans* (fig. 4), comme l'a montré la comparaison avec un échantillon authentique de ce composé, échantillon pour lequel nous remercions les laboratoires de la Société Firmenich.

La β-damascénone *trans* ne sent pas le rhum, aussi nous avons piégé les constituants responsables du pic A de la figure 3, et nous les avons réinjectés sur une colonne

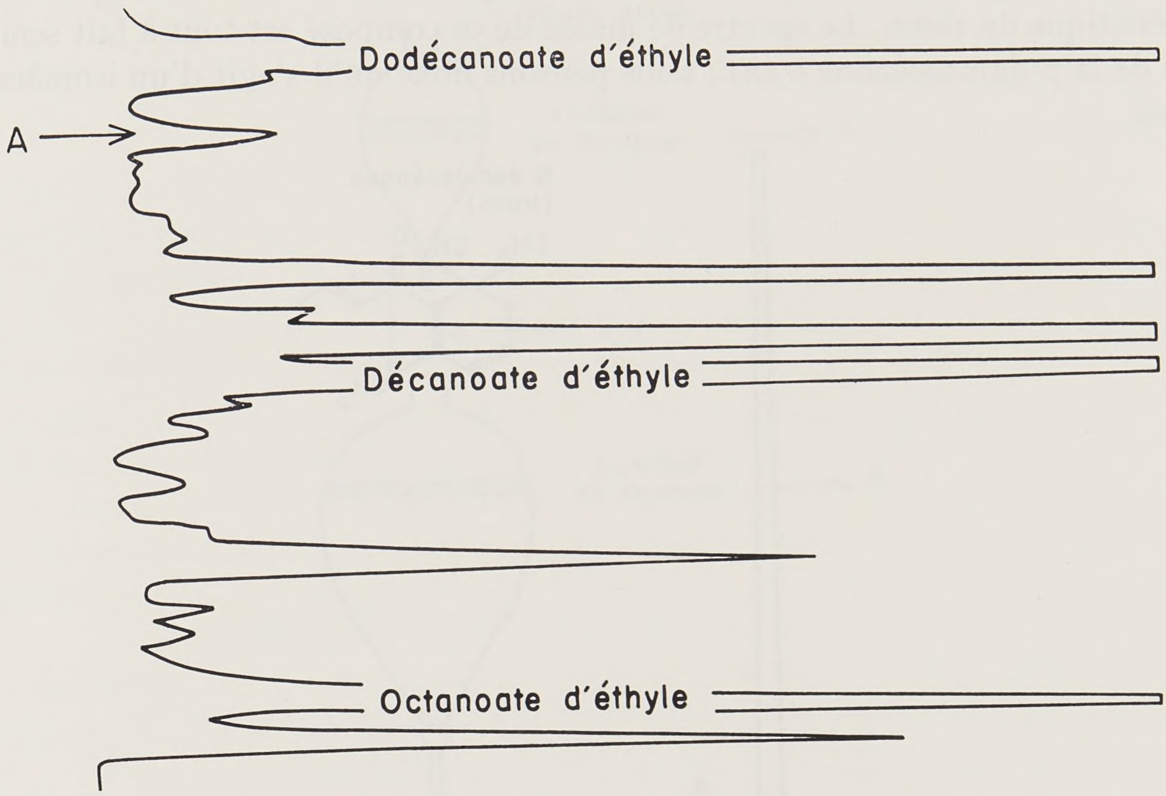



FIG. 3. — *Repérage olfactif du pic « A » présentant l'arôme caractéristique du rhum* (colonne OV 225)

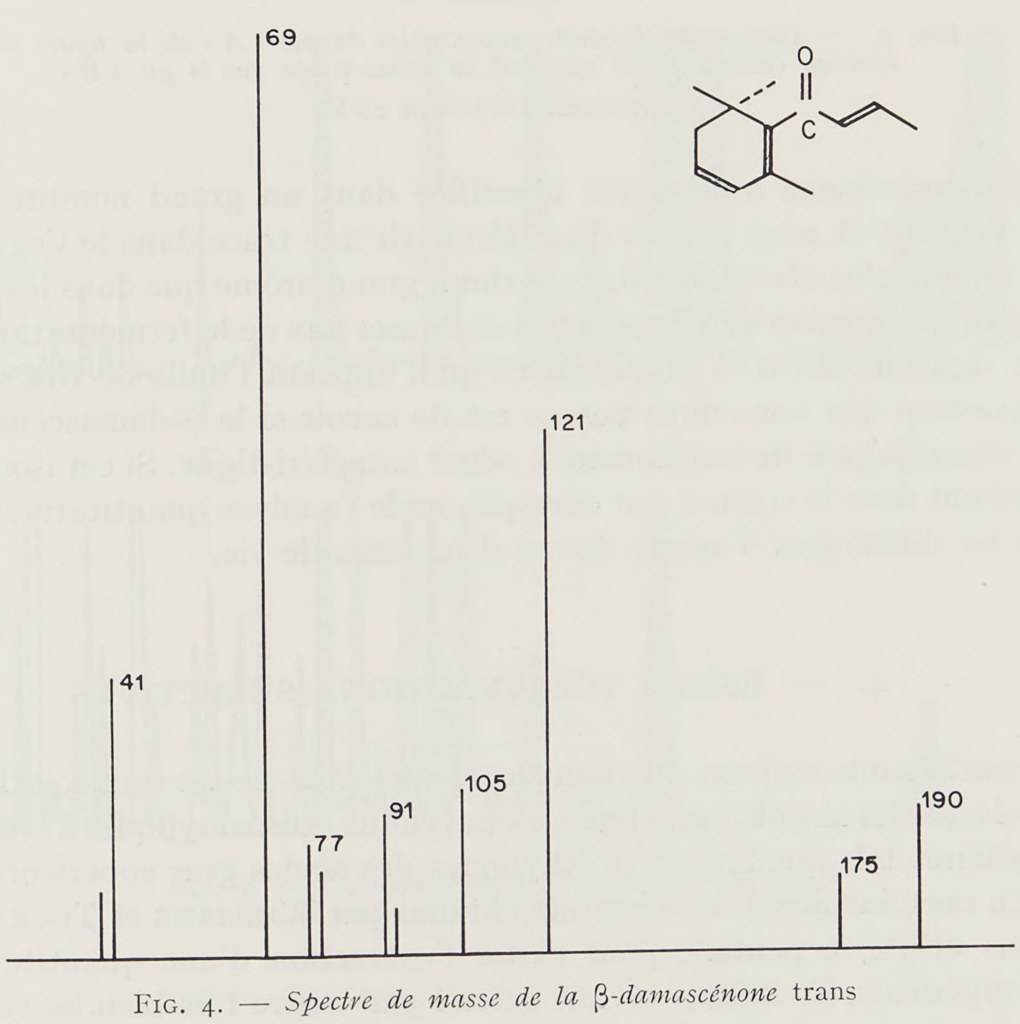



FIG. 4. — *Spectre de masse de la β-damascénone* trans

de polarité différente (Carbowax 20 M). Nous avons alors obtenu le chromatogramme de la figure 5, sur lequel le pic B correspond à l'élution du composé à odeur caractéristique du rhum. Le spectre de masse de ce composé est tout à fait semblable à celui de la β-damascénone *trans* ; nous pensons donc qu'il s'agit d'un isomère de ce composé.

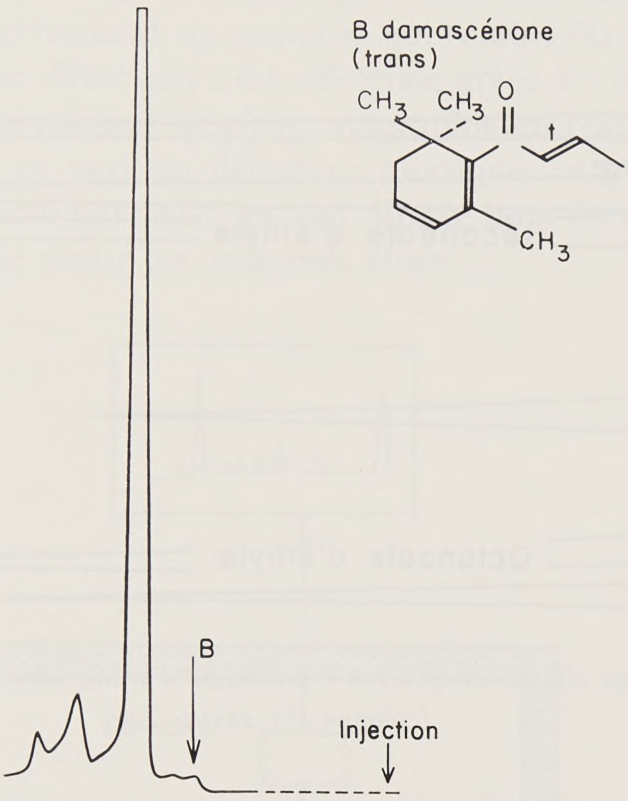



FIG. 5. — *Analyse des produits responsables du pic « A » de la figure 3. L'arôme caractéristique apparaît en même temps que le pic « B »*
(colonne Carbowax 20 M)

La β-damascénone *trans* a été identifiée dans un grand nombre de produits d'origine végétale et nous venons d'en découvrir une trace dans le Cognac.

Elle semble plus abondante dans le rhum grand arôme que dans les autres types de rhums, ce qui suggère qu'elle pourrait se former lors de la fermentation alcoolique, comme le signalait MICKO à propos de ce qu'il appelait l'huile de rhum.

La question que nous nous posons est de savoir si la β-damascénone *trans* est poujours accompagnée de son isomère à odeur caractéristique. Si cet isomère est également présent dans le cognac, par exemple, seule l'analyse quantitative pourra nous expliquer les différences d'arôme de ces deux eaux-de-vie.

## 4. — ESSAIS D'EXTRACTIONS SÉLECTIVES

Les constituants majeurs du « non alcool » des eaux-de-vie sont soit des composés polaires tels que les alcools propylique, isobutylique et isoamyliques ; soit des composés peu polaires tels que les esters éthyliques des acides gras supérieurs et certains acétals. En nous inspirant des résultats obtenus par WILLIAMS et TUCKNOTT (1973), nous avons utilisé le pentane pour éviter l'extraction d'une quantité importante d'alcools supérieurs. Ce même solvant extrait par contre très bien les composés peu solaires même lorsque le degré alcoolique de la solution hydroalcoolique est élevé.

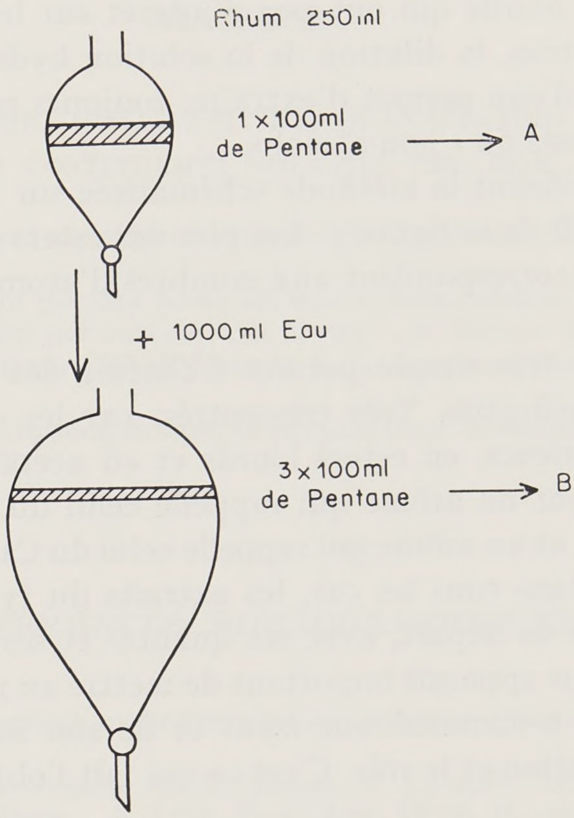



FIG. 6. — *Schéma d'une méthode d'extraction*

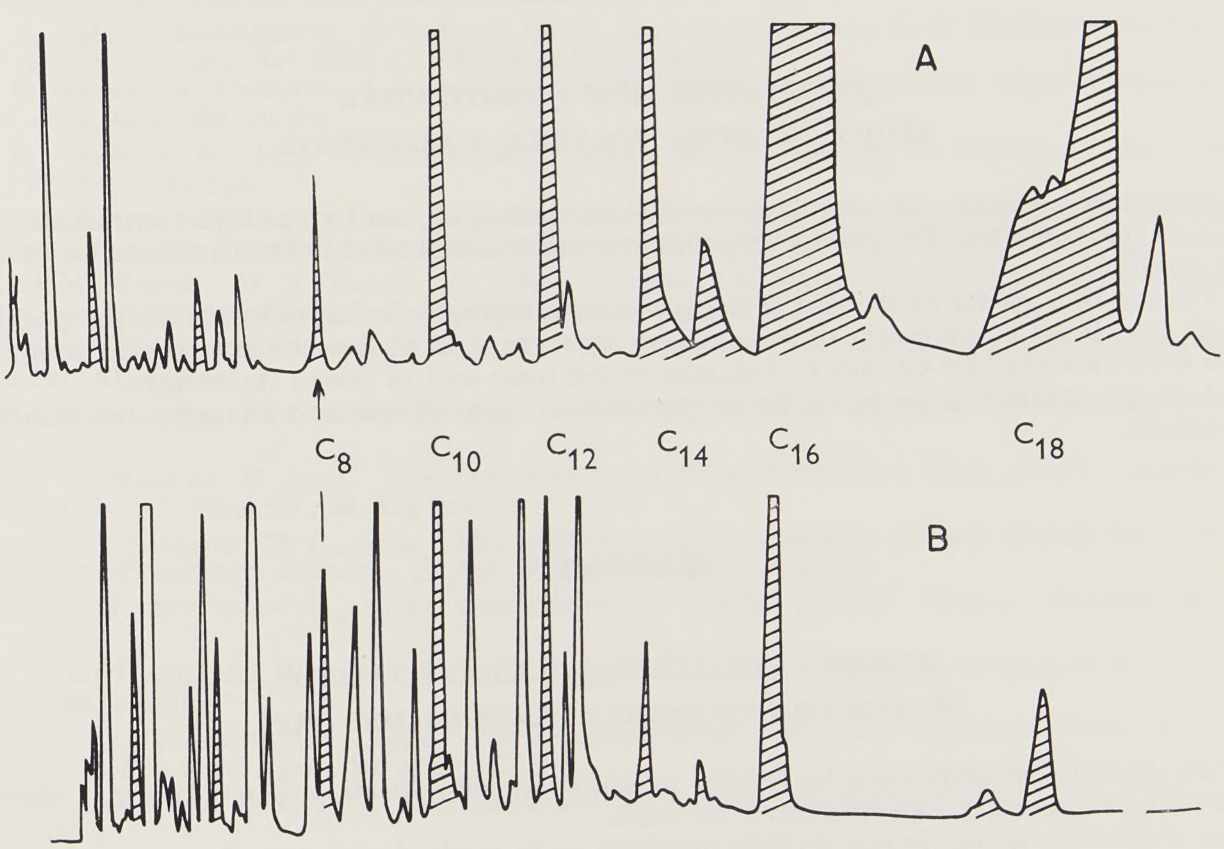



FIG. 7. — *Chromatogramme obtenu après extraction selon la méthode schématisée sur la figure 6*

C'est ainsi que, sur une eau-de-vie à 75 °GL, un seul traitement au pentane permet d'éliminer la majeure partie des esters éthyliques des acides gras supérieurs, et notamment des plus lourds qui ont peu d'intérêt sur le plan olfactif. A la suite de cette première opération, la dilution de la solution hydroalcoolique à 75 °GL par quatre fois son volume d'eau permet d'extraire, toujours par le pentane, les constituants les plus intéressants du « non-alcool ».

C'est ainsi qu'en utilisant la méthode schématisée sur la figure 6 on obtient les chromatogrammes A et B de la figure 7. Les pics des esters éthyliques sont hachurés et les numéros indiqués correspondent aux nombres d'atomes de carbone des acides de ces esters.

Cette méthodologie très simple permet d'obtenir des extraits très concentrés et, semble-t-il, très significatifs. Très concentrés, car les extraits du type B sont pauvres en alcools supérieurs, en esters lourds et en acétals. Très significatifs, car les extraits du type A ont un arôme qui rappelle celui du Cognac lorsque le rhum étudié est riche en esters, et un arôme qui rappelle celui du Calvados lorsque les acétals dominent. Par contre, dans tous les cas, les extraits du type B ont un arôme très proche de celui du rhum de départ, avec ses qualités et ses défauts.

Pour conclure, il nous apparaît important de mettre au point une méthode quantitative d'analyse de la β-damascénone *trans* et de son isomère, pour pouvoir en étudier le mode de formation et le rôle. C'est ce qui fait l'objet d'un travail en cours.

## SUMMARY


### QUALITATIVE AND QUANTITATIVE STUDY OF RUMS VOLATILE COMPONENTS

Secondary alcohols and volatile phenols were studied in rum by gas-liquid chromatography and mass spectrometry. The results are similar to what is indicated in the literature for rum and other spirits.

The use of a spliter at the end of the gas chromatographic columm has given the possibility to sniff the eluted components of several rum extracts, and to detect caracteristic compounds which were identified by GC-MS to β-damascenone *trans* and to one of its isomers.

A simple method is proposed for preparation of caracteristic and concentrated sample for GC analysis.


## RESUMEN


### ESTUDIO CUALITATIVO Y CUANTITATIVO DE LOS COMPONENTES VOLATILES DEL RON

Los alcoholes secundarios y los fenoles volátiles han sido estudiados en el ron, por cromatografía en fase gaseosa y espectrometría de masa.

La utilización de un divisor de flujo montado en la salida de columna de cromatografía, ha permitido apreciar los compuestos eluados para diversos extractos de ron, y detectar los compuestos característicos que han sido identificados por CPV-SM a la β-damascenona *trans* y a uno de sus isómeros.

Se propone un método sencillo para la preparación de extractos característicos y concentrados para el análisis en CPV.

# RIASSUNTO

## STUDIO QUALITATIVO E QUANTITATIVO DEI COSTITUENTI VOLATILI DEL RUM

Sono stati studiati gli alcooli secondari e i fenoli volatili nel rum mediante gas-cromatografia e spettrometria di massa.

L'impiego di un divisore di portata posto all'uscita della colonna di cromatografia ha permesso di sentire i composti eluiti per vari estratti di rum e di rilevare dei composti caratteristici che sono stati identificati mediante CPV-SM con la β-damascenone *trans* e con uno dei suoi isomeri.

E' stato proposto un metodo semplice per la preparazione di estratti caratteristici e concentrati per l'analisi mediante CPV.

# RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Allan D. A., 1973. A new approach to the identification of flavour compounds in rum. *Austral. Wine Brew., Spirit Rev.*, 42-44.

Baldwin S., Black R. A., Andreasen A. A., Adams S. L., 1967. Aromatic congener formation in maturation of alcoholic distillates. *J. Agric. Food Chem.*, **15** (3), 381-385.

Braus H., Miller F. D., 1958. Composition of whisky : steam-volatile phenols of fusel oil. *J. Ass. Off. Agric. Chem.*, **41** (1), 141-144.

Bricout J., 1971. Analyse de quelques constituants dérivés du chêne dans les vieilles eaux-de-vie d'Armagnac. *Ann. Technol. agric.*, **20** (3), 217-223.

Day E. A., 1967. Cheese flavour. In Schultz H. W., Day E. A., Libbey L. M. *Chemistry and physiology of flavours*, 331-361. Avi Publ. Co. Westport-Connecticut.

Dubois P., Brule G., Dekimpe J., 1972. Analyse des phénols volatils de deux rhums martiniquais. *Industr. alim. agric.*, **89** (1), 7-9.

Joseph E., Marche M., 1972. Contribution à l'étude du vieillissement du Cognac. *Connaissance Vigne Vin*, **6** (3), 273-330.

Kahn J. H., Shipley P. A., La Roe E. G., Conner H. A., 1969. Whisky composition : identification of additional components by gas chromatography-mass spectrometry. *J. Food Sci.*, **34**, 587-591.

Liebich H. M., Koenig W. A., Bayer E., 1970. Analysis of the flavour of rum by gas-liquid chromatography and mass spectrometry. *J. Chromatogr. Sci.*, **8**, 527-533.

Maarse H., ten Noever de Brauw M. C., 1966. The analysis of volatile components of Jamaica rum. *J. Food Sci.*, **31**, 951-955.

Micko K., 1908. Selon Kervegant D., 1946. *Rhums et eaux-de-vie de canne.* Éditions du Golfe, Vannes.

Nishimura K., Masuda M., 1971. Minor constituents of whisky fusel oils. I. Basic, phenolic and lactonic compounds. *J. Food Sci.*, **36**, 819-822.

Steinke R. D., Paulson M. C., 1964. The production of steam volatile phenols during the cooking and alcoholic fermentation of grain. *J. Agr. Food Chem.*, **12** (4), 381-387.

Suomalainen H., Nykanen L., 1970. Composition of whisky flavour. *Process. Biochem.*, **5** (7), 13-18.

Timmer R., ter Heide R., Wobben H. J., de Valois P. J., 1971. Phenolic compounds in rum. *J. Food Sci.*, **36**, 462-463.

Williams A. A., Tucknott I. G., 1973. The selective extraction of aroma components from alcoholic distillates. *J. Sci. Food Agric.*, **24**, 863-871.

Yokota M., Fagerson I. S., 1971. The major volatile components of cane molasses. *J. Food Sci.*, **36**, 1091-1094.

*Ann. Technol. agric.*, 1975, **24** (3-4), 317-324.

# THE NEED FOR MAXIMUM PRODUCT VERSATILITY IN TROPICAL DISTILLERIES OF THE FUTURE

J. A. P. I'ANSON

*Peter I'Anson Distillery Services Limited, Sheraton House,*
*Ashurst, Tunbridge Wells,*
*Kent, (England)*

SUMMARY

The author examines the present sugar cane growing countries and their need for alcohol, the difficulty of molasses disposal in landlocked countries remote from direct shipping routes to world markets, types of alcohol required and ultimate uses, the production of theses types of alcohol at lowest cost incorporating maximum distillery versatility.

## I. — PRESENT SUGAR CANE GROWING COUNTRIES AND THEIR NEEDS FOR ALCOHOL

More and more it becomes very obvious that basically the new emerging tropical nations of the world, who have divested themselves of their previous Colonial owners, are in constant need of self-sufficiency in as many basic materials as are possible. For each and every one of them to produce for themselves, commodities such as meats, fish etc. on the protein side, together with the many tropical starch crops and other basic needs of life.

Many of these new countries, especially the ones now within the terms of the European Community, the A.C.P. countries, either grow sugar cane or are seriously thinking of initiating a sugar cane industry. The population of the world is increasing, the need for sugar is increasing, so it would be, we venture to say, a fairly constant growth factor for the future sugar cane industry.

Apart from proteins and carbohydrates, and at this stage in our thinking forgetting other raw materials, we come to the necessity for alcohol for a host of various uses. Depending on the economic situation of each country and its growth, naturally the demand for alcohol in its many uses will vary.

It is interesting to note that, in the author's experience, once locally produced alcohol is made and available in any particular country, it is surprising to how many uses this alcohol is put, which in fact were not shown in any particular Market Survey for either the use of the alcohol or the quantity required.

The reason for this is, of course, that alcohol can be used for so many diverse processes and it is not until it is available that local manufacturers can use it as a substitute for many imported raw materials and chemical reagents.

We must also take into account the world economic situation and the ever spiralling costs and, of course, the problem of the continuously increasing cost of oil.

Alcohol, as we all know, is not only a beverage but a readily available source of power, not, we agree, with the thermal efficiency of oil and its by-products, but nevertheless it is a source of heat and power and all countries require these essentials, be they temperate or tropical.

We believe that, in the future, further research will be undertaken into the possibility of using alcohol as a source of power in the industrial sense, but at this stage let us keep to the present time and perhaps a few years ahead. The average tropical country needs alcohol in one form or another for the following purposes :

1. source of heat for cooking purposes,
2. source of light,
3. for surgical purposes,
4. for pharmaceutical purposes,
5. for cosmetic purposes,
6. as a mixing reagent for paints,
7. for alcohol beverages of all types,
8. as the prime mover of vehicles, or in admixture with petrol,
9. as a solvent for many chemical, biochemical and engineering processes,
10. as a basis for the Essential Oil industry, especially so in the countries we are discussing,
11. as a stepping stone in the production of vinegar.

The list of uses is capable of expansion to a virtually unlimited degree.

For countries not producing their own alcohol, the import bill for quantities of alcohol for all these purposes must be a considerable drain on their economy and we believe that any country now producing sugar and perhaps only producing small quantities of potable alcohol, should seriously consider the possibility of increasing their alcohol production in order to become self-sufficient in so many processes, as described above.

## 2. — DIFFICULTY OF MOLASSES DISPOSAL

We can think of many countries which grow sugar but are unable easily to dispose of their molasses for reasons of geographical situation and cost.

When one realises that if the molasses is converted to alcohol, then for every hectolitre of molasses that would have to be shipped out, approximately only one third of a hectolitre of alcohol would replace the initial quantity of molasses, it

becomes more and more apparent that unless there is a ready local need for molasses for cattle feed etc., the obvious solution would be to convert the molasses, or a large proportion of the molasses, to alcohol, and thus save time and money.

In one instance that we know of in Africa, a certain country produces large quantities of molasses which are run to waste, and at the same time, is importing alcohol for potable and industrial needs from another country. This is a perfect example of the theme we are trying to stress in this short paper.

We believe that sometimes the very word « Distillery » conjures up complex plant and equipment and high costs, either to the local Government or local Sugar Manufacturers, and therefore the situation is left to coast along as no-one really gets to grips with the problem and sees exactly how the situation could be solved and costed.

We are fully aware that many distillation units in the Tropics are of a complex and costly nature, especially in the case of high quality versatile Rum distilleries, but we feel now, with much experience behind us, that we can rationalise the process. We believe it incumbent on all Governments to study carefully the question of obtaining a reasonable return, both industrial and beverage wise, as against the costlier practice of either dumping molasses or shipping at high cost to terminal ports.

## 3. — THE TYPES OF ALCOHOL REQUIRED AND ULTIMATE USES

We believe that the following types of alcohol are required in all such countries as we are discussing, and this list would cover most uses :

1) extra neutral spirit at 97° alcoholic strength. Uses : gin distillation, vodka manufacture, pharmaceutical use, cosmetic use ;
2) very light or light rums to replace on the beverage market any obnoxious local « cottage industry » spirituous beverage, or may we venture the word « poison » ;
3) industrial alcohol for all purposes in industry and also, if necessary, for methylating before use, depending on local Customs and Excise laws anp procedures.

Any country having these alcohols available from their own locally produced molasses will surely be in a sound economic situation, and will be well guarded against the vagaries of production costs, shipping problems etc. of the imported product.

In the case of alcohol of type (1), it is now entirely proven that gin and vodka, equal in all respects to those spirits produced in the traditional countries, can be distilled. This is a fact and one that must be forcefully brought home to all the authorities of the countries we are discussing.

In the case of gin, we sincerely believe that this can best be distilled by using locally made spirit with imported aromatics of the highest quality. It is no good producing clean alcohol and then spoiling it by using a gin essence of inferior quality.

With regard to vodka, there are various processes used for this product and again we believe that only the best methods must be utilised.

Besides gin and vodka, there is, of course, the vast spectrum of liqueurs, and how many countries are there to-day with their own alcohol who are perhaps sitting on an unknown liqueur from a local fruit or such. Some typical examples are not difficult to think of.

*Pharmaceutical spirit*

This spirit would be of the same quality as (1) and would be used for all purposes such as surgical and cosmetic etc. Obviously, with regard to CUSTOMS and EXCISE duties, it could be denatured by the use of certain bland denaturants, thus allowing it for ultimate use without duty payments.

*Very light or light Rums*

Many countries have historically produced as a « cottage industry » their own types of raw and, in many cases, harmful spirits. These spirits can be made from sugar, molasses, grains, fruits, palms and many other raw materials.

Some are historically the « wine of the country » whilst others are harmful to a degree and should be banned. If this were to happen, then surely the alternative is to distill from the locally produced molasses, a very light type of rum, the style depending on what local taste dictates.

There is much cane spirit being produced in several countries in Africa to-day and we believe that others would be wise to follow in their footsteps.

*Industrial alcohol*

By this, we mean the high strength alcohol produced at 97° suitable for all the industrial purposes mentioned above and for methylation by the addition of denaturants together with the various by-products from the production of the first three types of alcohol.

Thus we see that provided we have a constant supply of molasses of a reasonable quality, and also the necessary water and power supply for the distillery (the distillery is usually placed adjacent to a sugar factory, but, if this is not possible, small quantities of oil would have to be imported for use in steam raising), we can produce four main types of alcohol.

Our problem is how to obtain these at minimum cost, both plant wise and production wise.

In our experience, we have advocated and practised such methods as re-rectification of low grade alcohol from a basic two column still and then further in order to get a reasonable quality potable spirit, again to re-rectify this spirit, in all probability by the batch method, to obtain a spirit capable of being converted into high quality gin etc.

If this type of plant is already available on the site or in the country, then it all probability, there is some way in which modifications and additions can be made to suit the requirements.

## 4. — PRODUCTION OF VARIOUS TYPES OF ALCOHOL

In the case of a new « grass roots » project and after all our experience, we would now recommend the use of a plant incorporating a simple automatic molasses/water/acid mixing unit, the utilisation of a basic yeast plant, fermentation based on the incremental process, with fermentation cooling dependent on water supplies, temperatures etc. and then the distillation of the various alcohols on a continuous five-column distillation unit.

First and foremost, we are strongly of the opinion that in the majority of cases, available funds for any new project will be limited and neither will there be available a large fund of experienced operators, so, therefore, it is imperative that the complete plant be kept to the most simple form both in plant and process layout.

A brief description of a typical plant would be as follows.

### 1. — *Molasses storage and measurement*

We are strong believers in the use of alternating daily molasses receivers from the main molasses storage tanks. These receivers are equipped with accurate measuring devices, thus allowing the operator an exact knowledge of the amount of molasses entering the process.

### 2. — *Molasses dilution*

Over the years, we have developed a complete packaged unit for this purpose. This unit has proved itself time and again in use and has now turned relatively onerous methods of batch mixing, large mixing tanks with consequent uneven gravities, into a thing of the past. The unit consists of a molasses pump, a water pump, acid and nutrient mixing unit, and by the simple pressing of starter buttons the various pumps will feed the main and lesser ingredients of the mix into a common mixing device incorporated in the unit ; the resulting final mixed molasses wash is pumped from this unit into the fermenting vessels at a pre-determined rate usually in keeping with the feed rate of the fermented wash to the Still.

### 3. — *Yeast*

A very simple yeast plant is recommended and in view of the probable difficulties of obtaining laboratory staff capable of isolating special yeasts, it is recommended that Baker's yeast is used. This plant is a simple three vessel unit and delivers the requisite amount of fermenting bub to the fermenter in use. Thus the mixed wash from the mixing unit starts fermenting as soon as it arrives in the fermenting vessels and fermentation is under way all the time the vessel is being filled.

We have experimented with various ways of continuous fermentation but are not yet happy with this method with regard to rather remote and ill-staffed plants.

### 4. — *Fermentation*

Fermentation is completed in anything between 36 and 44 hours and if water is available at a reasonable temperature, then we certainly recommend the use of cooling for the fermentation process, for reasons about which we all know.

However, many is the time that water temperatures are so close to the fermentation temperatures that cooling is out of the question. No hard and fast rule can be made with regard to this problem and, therefore, each project must be viewed and examined on its own merits. Obviously, we want to get the best yield but must be careful of asking the operator to have to spend large sums of money on complicated cooling equipment unless the gains are going to be financially agreeable.

Therefore, we suggest we look at each project with the following cooling possibilities :

*a*) no cooling at all ;

*b*) cooling by means of outside spray ring, especially efficacious (but somewhat messy) if there is a constant breeze ;

*c*) cooling by using raw water supply either direct from main supply or by re-use through cooling towers. The contact between cooling water and fermenting wash takes place in external plate heat exchangers ;

*d*) depending on the economics and viability of the plant, then we would recommend use of the system in (*c*) above but using refrigerated water, which is obtained from a continuous recycling refrigeration unit. The economics of this last method must be carefully looked into from every aspect of the plant efficiency and costing.

### 5. — *Distillation unit*

In all the foregoing, we have tried to keep our main process units as simple as possible and in accordance with the operator's financial means but we now come to a unit which we believe because of the products it has to produce, must of necessity be somewhat complicated and we have therefore come to the conclusion that in order to produce the following products from the fermented wash, it is necessary to utilise a five column distillation unit for the production of the following 3 basic alcohol types :

1. extra neutral spirit ;
2. very light or light rums ;
3. industrial alcohol.

This unit is so designed as to be capable of changing its product pattern at very short notice. The Still would consist of an integrated unit basically having six distilling columns. These columns are as follows :

1. purifying column ;
2. heads concentration column ;
3. analysing column ;
4. rectifying column ;
5. hydro-selection column.

Basically the unit is operated according to the Spirit Type required and using the appropriate columns. Thus, a potential operator does not necessarily have to invest in the whole range of columns, but rather does he purchase the main basic building and ancillaries and for instance initially purchases only two columns, for the manufacture of Industrial Alcohol, *i. e.* analyser column, rectifying column.

Once his market for Industrial Alcohol is satisfied and he finds a market for light rum type beverages, he purchases from the Manufacturer a purifying column, heads concentration column giving him a dual purpose plant consisting of :

— purifying column and heads concentration column, analysing column, rectifying column.

Thus at this stage, he is capable of a diversification of products, and when the demand for higher grade alcohol for gin, vodka etc. is apparent then by the purchase of a preconcentration column and a hydro-selection column he would be equipped for all eventualities and in the course of this development would have been given ample time and opportunity to develop his markets and products without the costly and awesome spectre of unused capital plant burdening him in the early developments of the enterprise.

## 5. — CONCLUSIONS

In a few pages, we have tried to summarise the results of many years application of distillation practice in tropical countries and we apologise for the brevity and perhaps simplicity of this document, but again we must reiterate that we believe that in all the foregoing plant we have a simple and yet well tried system for the production of the various products mentioned, and these products to be produced from basic rax materials under trying tropical conditions with minimal scientific management.

We fully realise the many complicated and sophisticated systems for making alcohols and rums in the more civilized areas of the world, but in the context of this note we are trying to see the problem from the point of view of the poorer emergent tropical nations, desperate to be selfsufficient in alcohol production, and if in this paper we have been able to crystallise our thoughts on this subject, then we will, we hope, have gained something.

We are all engaged in our life's work, which is the conversion of sugar cane to its many alcoholic products and as such we must be prepared to put our experience and capabilities to our clients in a way most beneficial to them.


## RÉSUMÉ

### BESOIN D'UNE SOUPLESSE MAXIMALE DANS LES DISTILLERIES TROPICALES DE L'AVENIR

On analyse les besoins en alcool des pays actuellement producteurs de canne à sucre, les difficultés d'évacuation des mélasses dans les pays continentaux éloignés des routes commerciales, les types d'alcool désirés et leur usage, enfin la production de ces types d'alcool au plus bas prix.

## RESUMEN

### NECESIDAD DE UNA ADAPTABILIDAD MAXIMA EN LAS DESTILERIAS TROPICALES DEL FUTURO

Se procede al análisis de las necesidades en alcohol de los países actualmente productores de caña de azúcar, las dificultades de evacuación de las melazas hacia los países continentales alejados de las rutas comerciales, los tipos de alcohol deseados y su utilización y, finalmente, la producción de estos tipos de alcohol al precio más reducido.

## RIASSUNTO

### NECESSITA' DI UNA MASSIMA FLESSIBILITA' NELLE DISTILLERIE TROPICALI DEL FUTURO

Oggetto dello studio sono i fabbrsogni d'alcool dei paesi attualmente produttori di canna da zucchero, la difficoltà d'evacuazione delle melasse nei paesi continentali che si trovano lontano dalle strade commerciali, i tipi di alcool desiderati e il loro impiego ed infine la produzione di questi tipi d'alcool al prezzo più basso.

*Ann. Technol. agric.*, 1975, **24** (3-4), 325-333.

# IMPORTANCE DE LA LIGNINE DANS LE VIEILLISSEMENT DES RHUMS

C. JOURET et J. L. PUECH

*Laboratoire de Technologie des Produits végétaux,*
*Centre de Recherches agronomiques de Toulouse, I. N. R. A.,*
*31320 Castanet*

## RÉSUMÉ

La maturation des rhums s'effectue en fûts de chêne, La conservation dans ce type de récipients détermine l'évolution des caractères organoleptiques et l'apparition des qualités gustatives particulières des eaux-de-vie vieillies. Placée au contact du bois, l'eau-de-vie s'enrichit, par extraction, en plusieurs substances, les tannins, les hémicelluloses et la lignine paraissant les plus importants.

La lignine, sujet de notre travail, par hydrolyse et oxydation ultérieure, est à l'origine de plusieurs composés, en particulier d'aldéhydes aromatiques, qui participent à la formation de l'arôme. En appliquant le dosage des radicaux méthoxyles de VIEBÖCH, SCHWAPPACH et BRECHER, modifié par GRAN, nous avons déterminé dans des rhums d'âges variés, comparativement à des eaux-de-vie d'armagnac vieillies dans des conditions différentes, l'évolution de différentes fractions du complexe lignine.

## INTRODUCTION

Comme de nombreuses eaux-de-vie, les rhums peuvent être soumis à une conservation plus ou moins longue en fûts de chêne et acquérir, par suite, des caractères organoleptiques particuliers.

Les eaux-de-vie veillies longtemps sous bois se distinguent d'abord par un arôme que l'on peut qualifier de tertiaire (l'arôme primaire étant dû au bouquet du fruit et le secondaire à la résultante du métabolisme des micro-organismes durant la fermentation) et par un ensemble gustatif commun, si semblable, qu'un dégustateur, même averti, est parfois incapable de différencier un rhum d'un armagnac ou d'un calvados, alors que ces eaux-de-vie, fraîchement distillées, sont aisément reconnaissables.

Si l'on peut, bien entendu, impliquer dans ces phénomènes d'évolution de l'arôme

des pertes par évaporation ou par les transformations diverses de composés aromatiques initialement présents dans l'eau-de-vie, ces modifications sont également dues, pour une bonne part, aux substances extraites du bois de chêne par le milieu alcoolique, à leur évolution et à leur combinaison avec des composés préexistants ou ayant déjà subi certaines transformations.

Parmi les composants extraits du bois de chêne par les solutions alcooliques, la lignine occupe une place importante surtout par ses produits de dégradation (aldéhydes aromatiques en particulier) qui jouent un rôle sur les qualités organoleptiques des eaux-de-vie.

Il paraît, par suite, intéressant de déterminer la quantité de lignine et des produits en dérivant contenus dans les eaux-de-vie pour essayer de définir, dans une certaine mesure, un stade de maturité et un niveau de qualité.

## DÉFINITION ET CARACTÈRES GÉNÉRAUX DES LIGNINES

La lignine est un des éléments fondamentaux du bois ; substance propre aux végétaux supérieurs, elle incruste les membranes du tissu vasculaire et des éléments de soutien auxquels elle confère la rigidité. Elle représente de 18 à 30 p. 100 du poids de l'ensemble des matériaux membranaires.

Pour l'industrie papetière, elle a fait l'objet de très nombreux travaux de recherches, mais elle reste cependant encore mal connue et aucune des représentations proposées jusqu'ici ne donne entière satisfaction.

Actuellement, le terme « lignine » est réservé aux constituants non glucidiques de la membrane cellulaire préalablement débarrassée des substances du bois extractibles par des solvants neutres.

Selon PEARL cité par DESMET (1971), la lignine n'a pas une constitution définie, mais se présenterait comme un système de substances amorphes, de haut poids moléculaire, chimiquement apparentées mais dont la structure peut varier.

De nombreuses observations incitent à penser que ces macromolécules ne sont pas toutes libres mais pour certaines seraient plus ou moins étroitement liées aux polysaccharides par des liaisons diverses ; ceci expliquerait l'impossibilité dans laquelle on se trouve habituellement de les isoler par la seule action des solvants neutres. Les unités élémentaires de ces polymères ont la structure du phénylpropane et varient suivant la classe des végétaux considérés ; pour les gymnospermes, il s'agit principalement d'unités du type gaïacylpropane ; pour les dicotylédones, on a des unités gaïacyl et syringylpropane et pour les monocotylédones, gaïacyl, syringyl et *p*-hydroxyphénylpropane. Ces différentes unités monomères sont reliées entre elles par des liaisons éther ou par diverses liaisons carbone-carbone.

Les lignines renferment la quasi totalité des groupements méthoxylés des bois : 15 p. 100 environ en poids pour les gymnospermes et de l'ordre de 14 p. 100 à 22 p. 100 pour les dicotylédones. On trouve également des groupements hydroxyles et des groupements carbonyles de nature cétonique. Elles présentent aussi, sur certaines chaînes latérales au moins, une double liaison susceptible de fixer les halogènes.

Elles s'oxydent facilement en donnant naissance, lorsque la réaction est effectuée par le nitrobenzène en milieu alcalin, à des aldéhydes aromatiques telles que

vanilline, aldéhydes syringique, coniférylique, *p*-hydroxybenzoïque, accompagnées de nombreux dérivés.

Par éthanolyse, c'est-à-dire traitement à chaud par l'éthanol en présence d'une faible quantité d'HCl, elles conduisent aux monomères de HIBBERT, mélange d'aldéhydes, d'étheroxydes et de cétones aromatiques.

Les solvants neutres ne permettent l'extraction que d'une portion réduite de la lignine du bois, connue sous le nom de lignine native (lignine soluble de FREUDENBERG). Le reste, réfractaire à cette action, soit 90 p. 100 de la lignine totale (lignine insoluble) exige des traitements énergiques pour être séparé des composants glucidiques membranaires.

Après avoir succinctement présenté quelques propriétés de la lignine et avant d'aborder le chapitre analytique, on peut retenir comme définition de la lignine dans le cas des eaux-de-vie celle donnée par SKOURIKHIN comme « l'ensemble des composés non volatils contenant les groupements méthoxyles ».

## MÉTHODES DE DOSAGE

Les premiers essais de détermination du taux de la lignine dans les eaux-de-vie sont dus à SKOURIKHIN (1959) et les techniques expérimentales étaient empruntées à la chimie du bois.

Cette dernière fait appel, pour isoler la lignine, aux acides minéraux forts, à l'acide sulfurique à 64-72 p. 100 et à l'acide chlorhydrique à 41-42 p. 100 donnant naissance aux lignines de KLASON et de WILLSTATTER. Mais ces méthodes directes ne sont pas applicables aux eaux-de-vie du fait, en particulier, de la surcharge due aux substances tannoïdes.

Une méthode volumétrique indirecte, basée sur le dosage des radicaux méthoxylés de VIEBÖCK, SCHWAPPACH et BRECHER (1930) dérivée du procédé pondéral de ZEISEL (1885) a été retenue par SKOURIKHIN. La teneur en méthoxyles admise pour la lignine de l'alcool de cognac était égale à 18 p. 100 de son poids suivant le chiffre donné par ZAITZEVA et NIKITIN pour la lignine de l'extrait aqueux du bois de chêne.

La technique du dosage des méthoxyles a été décrite sommairement dans l'ouvrage de SKOURIKHIN sur la technologie des eaux-de-vie (1968) ; tout récemment LITCHEV et BOJINOV (1973) ont proposé une variante volumétrique du dosage des méthoxyles suivant ZEISEL avec l'appareil décrit par SKOURIKHIN.

Pour notre part, nous avons utilisé l'appareil amélioré et la technique modifiée par GRAN (1952) pour la détermination des groupements alcoxyles.

Le détail de ce dosage est décrit dans le mémoire de DEIBNER *et al.* (1975).

Pendant la maturation de l'eau-de-vie, la lignine extraite du bois de chêne subit différentes réactions de dégradation et de polymérisation. Les nombreux composés formés peuvent être classés en diverses fractions d'après leur solubilité dans l'eau et l'oxyde de diéthyle et d'après leur volatilité (SKOURIKHIN, EFINOV, 1966). On peut ainsi différencier la somme de la lignine d'extraction et des substances non volatiles de sa dégradation (lignocomplexe non volatil), une fraction insoluble dans l'eau et, séparément dans une fraction éthérosoluble, les substances volatiles et non volatiles.

On peut exprimer conventionnellement la quantité des substances méthoxylées non volatiles en acide vanillique et celle des substances méthoxylées volatiles en aldéhyde vanillique.

## RÉSULTATS ET DISCUSSION

Les résultats des analyses effectuées sur divers échantillons de rhums des Antilles françaises, d'âge et d'origine certains, ont été rassemblés dans les tableaux ci-dessous.

Dans le tableau 1, les résultats sont exprimés en groupements méthoxylés en mg/l d'alcool pur pour éliminer, dans une certaine mesure, l'influence du degré alcoolique.

TABLEAU I

*Teneur en méthoxyle d'échantillons de rhums antillais d'âges divers*
Résultats exprimés en mg/l 100°GL

| Échantillon | Années de garde en fût | Degré alcoolique 20°C (°C) | Lignocomplexe non volatil | Fraction lignocomplexe insoluble dans l'eau | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | p. 100 du lignocomplexe |
| Guadeloupe | 3 | 60,5 | 261,9 | 51,3 | 19,6 |
| | 5 | 59,7 | 275,4 | 62,2 | 22,6 |
| | 7 | 62,1 | 440,4 | 90,2 | 20,5 |
| Martinique I | 0 | 50, | 4,2 | — | — |
| | 6 | 44 | 249,3 | 11,8 | 4,7 |
| | 15 | 44 | 212,7 | 15,7 | 7,4 |
| Martinique II | 1 | 65 | 31,8 | 7,7 | 24,2 |
| | 3 | 66,1 | 158,4 | 41,7 | 26,3 |
| | 5 | 71,75 | 310,8 | 75,4 | 24,3 |
| | 8 | 72,60 | 227,6 | 57,6 | 25,3 |

TABLEAU I (*suite*)

*Teneur en méthoxyle d'échantillons de rhums antillais d'âges divers*
Résultats exprimés en mg/l 100°GL

| Échantillon | Fraction lignocomplexe soluble dans l'éther | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Globale | p. 100 du lignocomplexe | Non volatile | p. 100 du lignocomplexe | Volatile | p. 100 du lignocomplexe |
| Guadeloupe | 127,6 | 48,7 | 47,3 | 18,0 | 80,4 | 307 |
| | 134,5 | 48,8 | 26,5 | 9,6 | 107,9 | 39,2 |
| | 191,5 | 43,5 | 62,3 | 14,2 | 129,2 | 29,3 |
| Martinique I | 17,2 | — | 1,2 | — | 16,0 | — |
| | 135,9 | 54,5 | 39,6 | 15,9 | 96,3 | 38,6 |
| | 119,7 | 56,3 | 30,1 | 14,2 | 89,6 | 42,1 |
| Martinique II | 44,6 | — | 6,7 | — | 37,9 | — |
| | 110,8 | 69,9 | 29,5 | 18,6 | 81,3 | 51,5 |
| | 194,5 | 62,6 | 52,3 | 16,8 | 142,3 | 45,8 |
| | 113,1 | 49,7 | 38,6 | 17,0 | 74,4 | 32,7 |

TABLEAU 2

*Teneur en lignine d'échantillons de rhums antillais d'âges divers*
Résultats exprimés en mg/l 100°GL

| Échantillon | Années de garde de fût | Degré alcoolique 20°C (°C) | Lignocomplexe non volatil | Fraction lignocomplexe insoluble dans l'eau | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | | | p. 100 du lignocomplexe |
| Guadeloupe | 3 | 60°5 | 1 456,2 | 410,2 | 28,2 |
| | 5 | 59°7 | 1 531,1 | 497,6 | 32,5 |
| | 7 | 62°1 | 2 448,6 | 721,5 | 29,5 |
| Martinique I | 0 | 50° | 23,0 | — | — |
| | 6 | 44° | 1 386,2 | 94,1 | 6,79 |
| | 15 | 44° | 1 182,4 | 125,3 | 10,6 |
| Martinique II | 1 | 65° | 176,8 | 61,4 | 34,8 |
| | 3 | 66°1 | 880,4 | 333,7 | 37,9 |
| | 5 | 71°75 | 1 728,3 | 603,3 | 34,9 |
| | 8 | 72°60 | 1 265,4 | 460,5 | 36,4 |

TABLEAU 2 (*suite*)

*Teneur en lignine d'échantillons de rhums antillais d'âges divers*
(Résultats exprimés en mg/l 100°GL)

| Échantillon | Fraction lignocomplexe soluble dans l'éther | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Globale | p. 100 du lignocomplexe | Non volatile (en acide vanililique) | p. 100 du lignocomplexe | Volatile (en vanilline) | p. 100 du lignocomplexe |
| Guadeloupe | 709,5 | 48,7 | 256,4 | 17,6 | 393,9 | 27,0 |
| | 747,8 | 48,8 | 143,6 | 9,4 | 528,7 | 34,5 |
| | 1 064,7 | 43,5 | 337,7 | 13,8 | 633,1 | 25,8 |
| Martinique I | 95,8 | — | 6,5 | — | 78,5 | — |
| | 755,6 | 54,5 | 214,9 | 15,5 | 471,9 | 34,0 |
| | 665,5 | 56,3 | 163,1 | 13,8 | 439,0 | 37,2 |
| Martinique II | 247,9 | — | 36,31 | — | 185,7 | — |
| | 616,0 | 69,9 | 159,9 | 18,14 | 398,4 | 45,2 |
| | 1 081,4 | 62,6 | 283,5 | 16,4 | 697,3 | 40,3 |
| | 628,8 | 49,7 | 209,2 | 16,6 | 364,6 | 28,8 |

Nous avons également, dans le tableau 2, exprimé les résultats de lignine en mg/l d'alcool pur. Pour cela nous avons admis le coefficient de 18 p. 100 de méthoxyles dans le bois de chêne (SKOURIKHIN 1959). Pour la lignine insoluble, nous avons pris le coefficient de 11,50 que nous avons calculé directement sur une fraction de lignine insoluble d'un armagnac. D'après SKOURIKHIN (1968), la lignine brute de l'alcool de type cognac russe de 9 ans d'âge contient 11,38 p. 100 de méthoxyles ; débarrassée des hydrates de carbone, cette teneur devient égale à 12,58 p. 100. BALDWIN *et al.* (1969) ont trouvé dans la lignine d'extraction des alcools conservés en fûts de chêne blanc 15,7 p. 100 de méthoxyles et d'éthoxyles.

On peut noter, d'une manière générale, une augmentation du taux des différentes fractions de lignine.

La fraction insoluble dans l'eau varie avec le degré alcoolique de l'eau-de-vie. Elle est plus faible dans les rhums qui ont subi une réduction du degré alcoolique en vue de leur commercialisation du fait d'une précipitation et de la perte correspondante par filtration.

La fraction volatile extractible par l'éther diéthoxyle est toujours nettement supérieure à la fraction non volatile. Une partie de ces phénols volatils méthoxylés préexistent avant toute conservation en fûts comme le montre l'analyse du rhum fraîchement distillé. D'ailleurs DUBOIS et BRULÉ (1972) avaient mis en évidence divers phénols méthoxylés volatils dans des rhums jeunes.

TABLEAU 3

*Teneur en méthoxyle d'eaux-de-vie d'Armagnac*

Résultats exprimés en mg/l 100°GL

| | | Échantillons | | |
|---|---|---|---|---|
| | | Armagnac I | Armagnac II | Armagnac III |
| Années de garde en fût | | 31 | 20 | 32 |
| Degré alcoolique 20°C | | 49,30 | 50,30 | 48,75 |
| Lignocomplexe non volatil | | 217,5 | 273,8 | 640,3 |
| Fraction lignocomplexe insoluble dans l'eau | | 27,9 | 51,4 | 67,1 |
| | Lignocomplexe p. 100 | 12,8 | 18,8 | 10,5 |
| Fraction lignocomplexe soluble dans l'éther | Globale | 67,5 | 84,8 | 135,2 |
| | Lignocomplexe p. 100 | 31,0 | 30,9 | 21,1 |
| | Non volatile | 23,8 | 44,7 | 50,1 |
| | Lignocomplexe p. 100 | 10,9 | 16,3 | 7,8 |
| | Volatile | 43,6 | 40,1 | 85,1 |
| | Lignocomplexe p. 100 | 20,1 | 14,6 | 13,3 |

A titre comparatif, nous avons indiqué dans le tableau 3 les résultats trouvés sur des eaux-de-vie d'armagnac provenant d'une cave coopérative du Gers. Les résultats sont extraits d'un mémoire en cours de publication (DEIBNER *et al.* 1975).

On note également, dans ce cas, une augmentation du lignocomplexe avec la durée de conservation. Les différences essentielles avec les rhums résident dans le pourcentage plus faible du lignocomplexe insoluble dans l'eau et du taux de la fraction volatile extractible par l'éther.

Les différences peuvent provenir de la composition du bois de chêne ayant servi à la confection des fûts : chêne d'Amérique (*Quercus alba*) pour les rhums, et chêne du Limousin (*Quercus pedunculata*) pour les armagnacs ; GUYMON et CROWELL (1968) ont d'ailleurs indiqué que le chêne américain, surtout après brûlage, donnait plus d'aldéhydes aromatiques que le chêne du Limousin.

Il faut aussi remarquer que, par ces analyses, nous enregistrons uniquement une résultante des divers éléments intervenant dans la conservation des eaux-de-vie (nature du bois, traitement préliminaire, volume du fût, degré alcoolique de l'eau-de-vie, conditions de stockage, etc.) et que nous n'avons aucune donnée précise sur ceux-ci.

Pour conclure, on peut dire que le travail rapporté ici constitue une étude préliminaire sur le rôle important joué par la lignine dans le vieillissement des eaux-de-vie. La séparation et le dosage de différentes fractions du complexe lignine fournissent quelques notions complémentaires sur l'évolution globale des eaux-de-vie conservées en fût. Il reste cependant à déterminer les composants de chacune de ces fractions et à effectuer leur dosage individuel. Certains ont déjà fait l'objet d'études particulières. Ainsi les aldéhydes et les acides aromatiques constituant, entre autres, la fraction éthérosoluble, ont été dosés d'une façon semi quantitative par chromatographie sur papier et sur couche mince par divers auteurs. Pour notre part, nous les dosons par séparation sur colonne de Polyclar suivant la technique d'ALIBERT (1973). Les premiers résultats trouvés sur les rhums montrent que leur pourcentage quantitatif dans les fractions isolées reste relativement peu important : de l'ordre de 3 p. 100 pour les aldéhydes aromatiques comparativement à la fraction éthérosoluble volatile et de 2 à 16 p. 100 pour les acides aromatiques méthoxylés comparativement à la fraction éthérosoluble non volatile.

La poursuite de ces travaux jointe aux études concernant les tannins, les phénomènes oxydatifs, etc., devrait apporter une meilleure connaissance des mécanismes impliqués dans le vieillissement des eaux-de-vie et pourrait, par suite, permettre une approche plus rationnelle d'une maturation raisonnée.

*Reçu pour publication en août 1975.*

## SUMMARY

### THE IMPORTANCE OF LIGNIN IN THE MATURING OF RUM

Rum is matured in oak barrels. The use of this sort of container brings about the development of the organoleptic and gustative qualities characteristic of matured spirits. In contact with wood, the spirit is enriched in several substances : tannins, hemicelluloses and lignin appear to be the most important.

From lignin, the subject of our study, by hydrolysis and then oxydation, originate several compounds, particularly aromatic aldehydes that participate in the formation of the aroma. By titrating the methoxyl radicals with the method of VIEBÖCH, SCHWAPPACH and BRECHER, modified by GRAN, we were able to determine the evolution of different fractions of the lignin complex in rums of various ages, compared with armagnac brandies matured in various conditions.

## RESUMEN

### IMPORTANCIA DE LA LIGNINA EN EL AÑEJAMIENTO DEL RON

El añejamiento del ron tiene lugar en barricas de roble. La conservación en este tipo de recipientes determina la evolución de las características organolépticas y la aparición de las cualidades gustativas que son particulares de los aguardientes añejados. Al permanecer en contacto con la madera, el aguardiente se enriquece — por extracción — de varias sustancias : los taninos, las hemicelulosas y la lignina, que parecen ser las más importantes.

La lignina, objeto del presente trabajo, da origen a varios compuestos, por hidrólisis y oxidación, y en particular de aldehidos aromáticos, que participan en la formación del aroma. Aplicando la dosificación de los radicales metoxilos de VIEBOCH, SCHWAPPACH y BRECHER, modificada por GRAN, hemos determinado en el ron de edades diversas, comparativamente con ciertos aguardientes de Armagnac, añejados en condiciones diferentes, la evolución de distintas fracciones del complejo lignina.

## RIASSUNTO

### IMPORTANZA DELLA LIGNINA NELL' INVECCHIAMENTO DEL RUM

La maturazione del rum avviene in fusti di quercia. La conservazione in questo tipo di recipienti determina l'evoluzione dei caratteri organolettici e l'apparizione delle qualità gustative particolari alle acquaviti invecchiate. A contatto con il legno, l'acquavite si arricchisce, per estrazione, di diverse sostanze : tra le quali le più importanti sono : i tannini, le emicellulose e la lignina.

La lignina, che è l'oggetto del nostro lavoro, dopo un successivo processo di irdrolisi e d'ossidazione, origina diversi composti e in particolare delle aldeidi aromatiche che contribuiscono alla formazione dell'aroma. Applicando il dosaggio dei radicali metossili di VIEBOCH, SCHWAPPACH e BRECHER, modificato da GRAN, abbiamo determinato nei rum di diverse et à, confrontati a delle acquaviti di armagnac invecchiate in condizioni differenti, l'evoluzione di diverse frazioni del complesso lignina.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ALIBERT G., 1973. Séparation et dosage automatisés des acides phénoliques végétaux par chromatographie sur colonne de polyclar et spectrophotométrie dans l'ultraviolet. *J. Chromatogr.*, **80**, 173-185.

BALDWIN S., BLACK R. A., ANDREASEN A. A., ADAMS S. L., 1967. Aromatic congener formation in maturation of alcoholic distillates. *J. Agr. Food Chem.*, **15**, 381-385.

DE BAUN R. M., NORD F. F., 1951. A quantitative phloroglucinol HCl test in the evaluation of lignin preparations. *Tappi*, **34**, 71-73.

DEIBNER L., JOURET C., PUECH J.-L., 1975. Substances phénoliques des eaux-de-vie d'armagnac. I. La lignine d'extraction et les produits de sa dégradation. *Analusis* (en cours de publication).

DESMET J., 1971. *Étude de lignines au dioxanne de bouleau et d'épicéa extraites par acidolyse ménagée du bois.* Thèse nº C. N. R. S. : A. O. 5794 Fac. Grenoble 30-6-71.

DUBOIS P., BRULÉ G., 1972. Analyse des phénols volatils de deux rhums martiniquais. *Industr. alim. agr.*, **89**, 7-9.

GRAN G., 1952. Détermination of alkoxyl groups. I. Description of a modified apparatus. *Särtryck ur svensk Papperstidming*, **55**, 255-257.

GRAN G., 1953. Determination of alkoxyl groups. III. An investigation on the determination of methoxy in carbohydrate containing substances. *Särtryck ur svensk Papperstidming*, **56**, 179-180.

GRAN G., 1954. Determination of alkoxyl groups. V. Improved methods for the selective determination of methoxyl groups and for the simultaneous determination of methoxyl and ethoxyl groups. *Särtryck ur svensk Papperstidming*, **57**, 702-708.

GUYMON J. F., CROWELL E. A., 1968. Separation of vanillin, syringaldehyde and other aromatic compounds in the extracts of french and american oak woods by brandy and aqueous alcohol solutions. *Qual. Plant. Mat. Veg.*, **12**, 320-333.

LITCHEV V., BOJINOV A., 1973. (en bulgare). Sur le dosage de la lignine dans les distillats de cognac. *Lozarstvo i vinarstvo*, **22**, 37-43.

SARKANEN K. V., LUDWING C. H., 1971. *Lignins, occurrence, formation, structure and reactions* Wiley inter Science.

SKOURIKHIN J. M., 1959. (en russe). Étude de l'extrait de l'alcool de cognac : des substances tanniques, de la lignine et des sucres réducteurs. *Vinod. Vinograd., U. R. S. S.*, **19**, 28-36.

SKOURIKHIN J. M., 1968. (en russe) *Chimie de la production du coguac.* Ed. Pichtchevaya promyschlencst.

VIEBÖCK F., SCHWAPPACH A., 1930. Eine neue methode zur massanalytischen Bestimmung der methoxyl und athoxylgruppe. *Berä.* **63**, 2818-2823, 3207-3210.

ZEISEL S., 1885. Uber ein Verfahren zum quantitativen Nachweise von Methoxyl. *Sitzung d. k Akad. d. w. math. Naturwiss.*, **92**, 1431-1438.

ZEISEL S., 1886. Zum quantitativen Nachweise von Methoxyl. *Sitzung d. k. Akad. d. w. math. Naturwiss*, **93**, 341-344.

*Ann. Technol. agric.*, 1975, **24** (3-4), 335-342.

# TECHNICAL DETAILS OF A PROCESS TO MANUFACTURE INDUSTRIAL ALCOHOL FROM SUGAR CANE

O. MALDONADO, R., ESPINOSA C. ROLZ and A. E. HUMPHREY*

*Applied Research Division, Central american Institute for Industry, ICAITI, P. O. Box 1552, Guatemala (Guatemala C. A.)*

* *College of Engineering and applied Science, University of Pennsylvania, Philadelphia, Pen. 19174 (U. S. A.)*

## SUMMARY

An integrated process to produce ethyl alcohol, single cell protein, glucose syrups and pulp for paper manufacture is presented. Comparison to standard process for alcohol production from cane carbohydrates is done.

The proposed process is an alternative between strictly anaerobic fermentation and completely aerobic system, which permits a better utilization of sugar cane. Operational variables of the process will be set by economics market price and products demand.

## INTRODUCTION

Ethyl alcohol obtained from renewable resources such as agricultural products and by-products, could play an important economic role in those world regions where agricultural activity is based essentially on exporting agricultural products and where oil reserves are minimal or non-existing. Ethyl alcohol can be used as a fuel. It can replace fossil fuel as a basic raw material for the chemical industry. It can also be used to produce single cell protein (SCP) for food and feed uses.

One of the most important advantages of energy derived from agricultural products is that it is a renewable source. It involves energy conversions starting directly from the sun.

Since the early 1940 s, it has been a more economical process to obtain ethyl alcohol from petroleum derived ethylene than from fermentation of agricultural carbohydrates sources. However, the recent dramatic basic price increase of crude oil and the diminishing world-wide petroleum reserves has changed these economics.

There is at present a great opportunity for energy and basic chemicals production from agricultural products. Sugar cane appears to be among the most important crop to consider for these purposes because cane is among the most photosynthetically efficient crops and because it is an important agricultural product in Central American and similar areas.

Sugar cane in Central America has been for many years a traditional agricultural product. Hence, there is already an agricultural capacity developed for its production. Likewise, there is an enormous potential to increase the land available for producing cane. There were sixty cane sugar mills operating in Central America in 1972. In 1973 a total of 7 378 200 metric tons of cane were processed. This resulted in 350 796 metric tons of sulfited sugar and 64 038 metric tons of refined sugar (ICAITI, 1973).

Taking into consideration all of these facts a process has been proposed to utilize sugar cane in an integrated fashion in order to produce from it ethyl alcohol, SCP and pulp for paper. Some of the main technical aspects of this process are presented and discussed.

## DESCRIPTION OF THE PROCESS

The proposed process to manufacture ethyl alcohol from sugar cane is an integrated system designed to enhance sugar cane agriculture for its efficient conversion into alcohol to be used as a gasoline extender, fuel, solvent or as a raw material for the synthesis of ethylene and derived chemicals ; it also comprises single cell protein and pulp for paper production.

The main operations to be carried out in this integrated process are : extraction of sucrose from raw cane enzymatic digestion of cane pith, pulp production for paper manufacture (fig. 2), alcohol and single cell protein production and recovery (fig. 4).

### *Juice extraction, enzymatic digestion and pulp production*

Raw cane will be fed to a cane separator ; the cane separator C-4 (Canadian cane equipment Ltd.) is designed to separate cane stalks in two fractions : one of them is a damp sawdust-like material which consists of the pith with sugars and fibers of the inner part of the sugar cane plant. After using this equipment, only the cane pith will be exposed to extraction in the diffuser ; this previous step eliminates the processing of all the material (rind and pith) which is advantageous because it diminishes the installed capacity of the diffuser for a given production rate and avoids the extraction of impurities present in the rind.

The extracted material, almost free of soluble carbohydrates will be pretreated for enzymatic digestion using commercial cellulase initially, further investigations will be carried out to develop a process to produce locally this enzyme using molasses and cane bagasse with selected fungal strains.

The enzymatic digestion of cellulose present in the cane pith will be done using special designed reactors in such a way that cellulase will be adsorbed on bagasse during the reaction step and then, washed down with water for re-use.

The non-digestible material coming out from the reactor will be sent to an alcohol digestion pulping in order to produce pulp for some types of paper manufacture.

Glucose syrup produced will be utilized as an additional stream to feed the anaerobic fermentor increasing the fermentable carbohydrates content of sugar cane juice extracted in the diffuser, giving a higher yield of alcohol and cell mass based on the same sugar cane utilization.

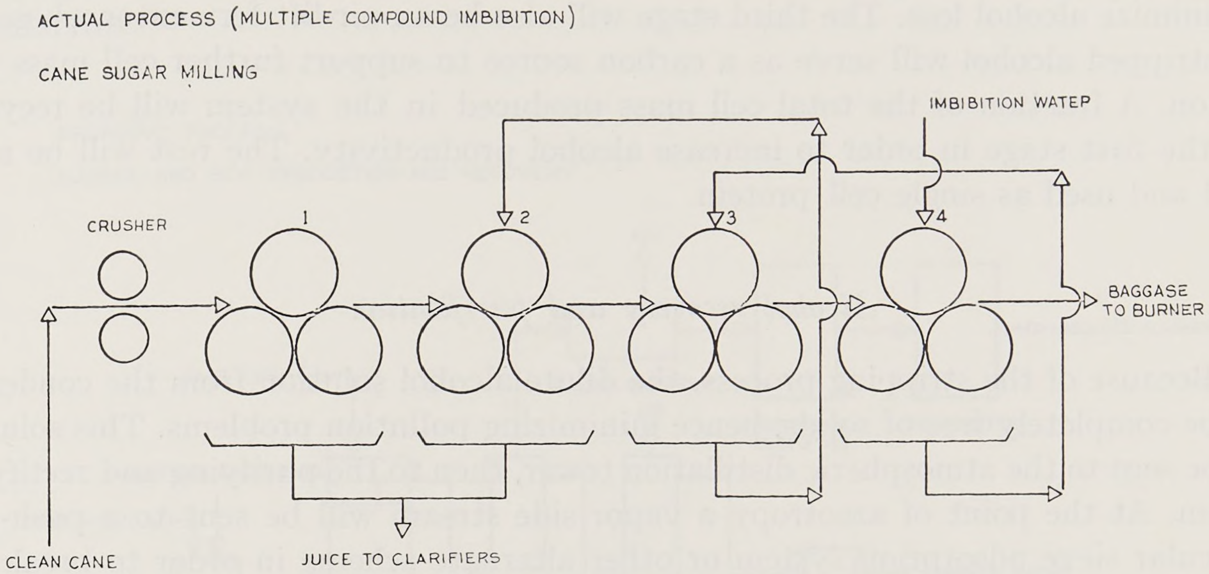



FIG. 1. — *Cane sugar milling, actual process*

The proposed process is diagramatically shown in figure 2. In figure 1 is shown the actual milling process which uses compound inhibition of crushed cane for juice extraction.

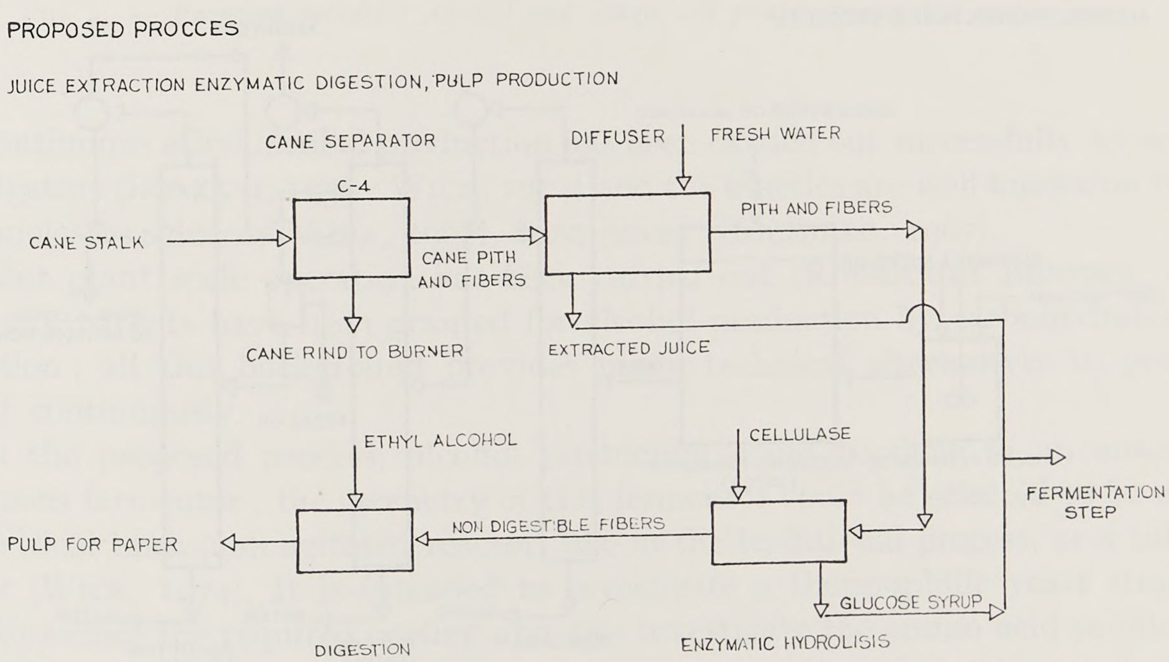



FIG. 2. — *Proposed process : Juice extraction, enzymatic digestion, pulp production*

## *Ethyl alcohol and single cell protein production and recovery*

The extracted juice will be continuously converted to ethanol and single cell protein by a three-step fermentation system. The first will be an anaerobic stage where a high yeast concentration converts sugar into alcohol with very low micro-

bial growth. The effluent from the first step will be stripped in the second stage from its alcohol in an air-lift fermentor. Some nitrogen source will be added to enhance yeast growth on the sugar not converted previously into alcohol. The air, containing water and alcohol, coming out of this stage will be sent to a condenser where most of the alcohol will be recovered. The air will be recycled to second and third stages to minimize alcohol loss. The third stage will also be an air-lift fermentor where the non-stripped alcohol will serve as a carbon source to support further cell mass production. A fraction of the total cell mass produced in the system will be recycled into the first stage in order to increase alcohol productivity. The rest will be recovered and used as single cell protein.

### *Alcohol recovery and purification*

Because of the stripping process, the dilute alcohol solution from the condenser will be completely free of solids, hence minimizing pollution problems. This solution will be sent to the atmospheric distillation tower, then to the purifying and rectifying system. At the point of azeotropy a vapor side stream will be sent to a push-pull molecular sieve adsorption system or other alternate scheme in order to break the azeotropic composition, to produce absolute alcohol. The economic parameters of this separation process will be compared to those of the standard process used in industry for alcohol dehydration (fig. 4). In figure 3 is shown the actual process for alcohol production and recovery (SHREVE, 1967 ; PATURAU, 1969).

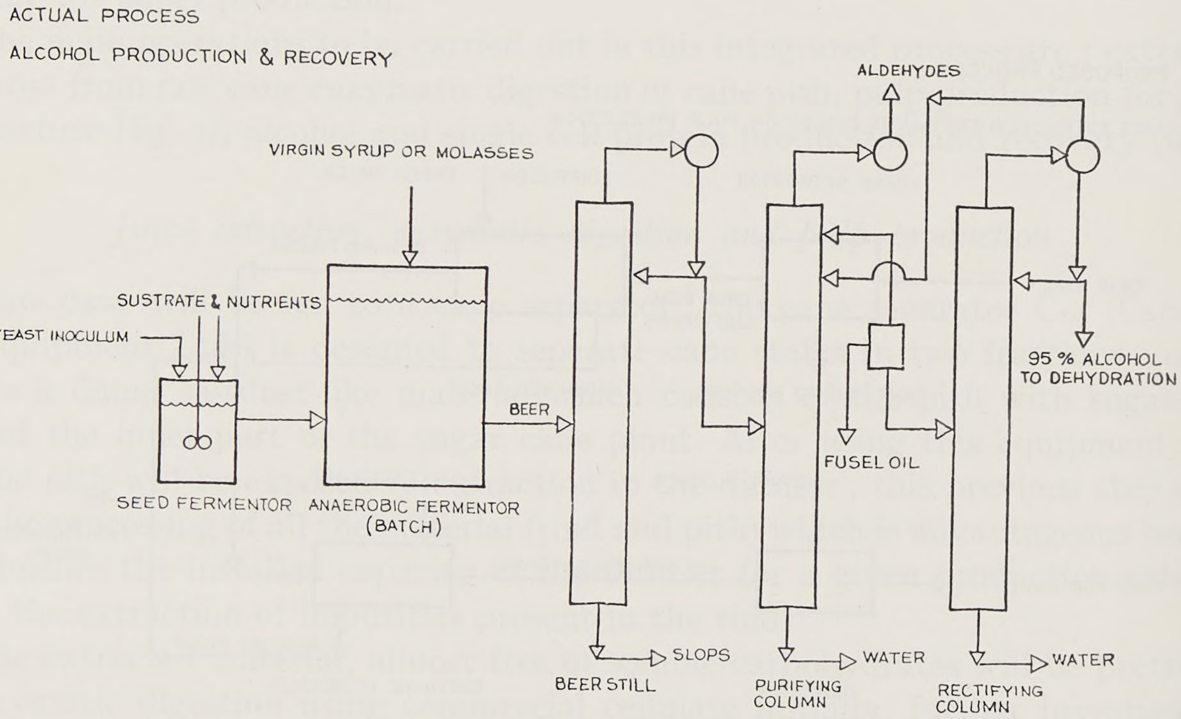



FIG. 3. — *Alcohol production and recovery, Actual process*

### *General comments of the proposed process*

In the traditional alcohol production system, sugar cane is utilized partially only because if the process uses either virgin syrup or molasses, all bagasse is burned for steam production using only its calorific power (HUGOT, 1960 ; MEADE, 1964).

Besides, the distillers bottoms or spent wash are not recovered and constitute a pollution problem (Paturau, 1969).

The proposed methods is an integrated continuous process for better utilization of sugar cane since it involves the production of ethyl alcohol, single cell protein of high quality, glucose from the enzymatic hydrolisis of bagasse and pulp for paper manufacture.

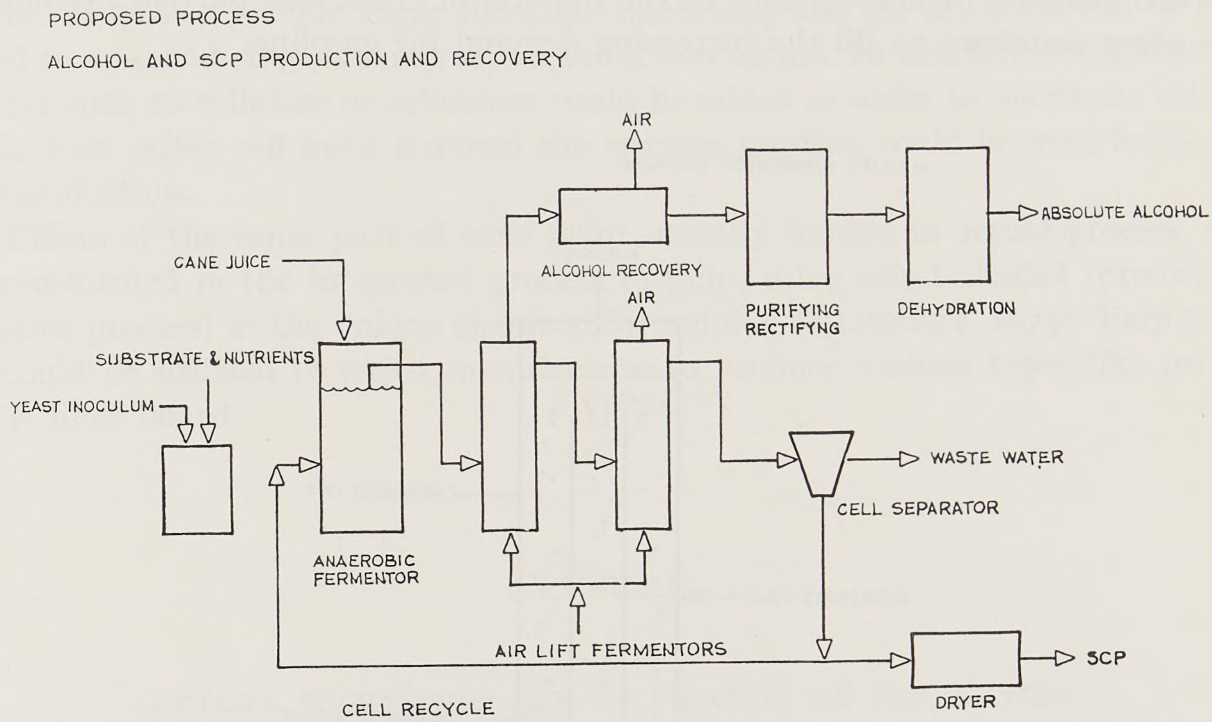



Fig. 4. — *Proposed process : Alcohol and single cell protein production and recovery*

Continuous ethyl alcohol production has been carried out successfully by several investigators (Borzani, 1957 ; Wick, 1974) and the kinetics are well known on blackstrap molasses, glucose (Aiba, 1968), fruit juices (Holzberg, 1967).

Pilot plant scale operation has been carried out (Rodriguez Benitez, 1968) and many patents have been granted for alcohol production by carbohydrates fermentation ; all this background provides many technical alternatives to produce alcohol continuosly.

In the proposed process, alcohol production could be done in an anaerobic continuous fermentor ; the geometry of this fermentor could be selected to be either a cylindrical tank (non agitated reactor) like in the traditional process, or a tubular reactor (Wick, 1974). It is intended to investigate a thermophilic yeast strain in order to reduce the required cooling and also investigate the amino acid profile and other desirable sedimentation and physical characteristics of yeasts, required for reactor optimization design.

In order to have a double purpose process of alcohol and single cell protein production from fermentable cane carbohydrates, the process could be operated in a three fermentation steps : first one was described above with two fermentor design alternatives. The second fermentation step is an alcohol stripping using high air rates and cell mass production in aerobic pathway ; this step could be done in an air lift fermentor (fig. 5) which provides the required aeration. Alcohol stripping from

culture medium has been studied before (HAMMER, 1965) and it is possible to design a system to recover all the stripped alcohol.

The main use intended for the ethyl alcohol produced by the proposed process is for blending with gasoline as an extender of it. Mixtures of 10 p. 100 ethyl alcohol, 90 p. 100 gasoline volumen-volumen have been used in actual automobile engine and the mixture can be burned efficiently without necessitating major carburetor modification (CLARK, 1971). The use of such mixtures will favor Centralamerican countries fuel economy which depends of the imports of crude and partially refined oils from other countries to fill the increasing demand for gasoline.

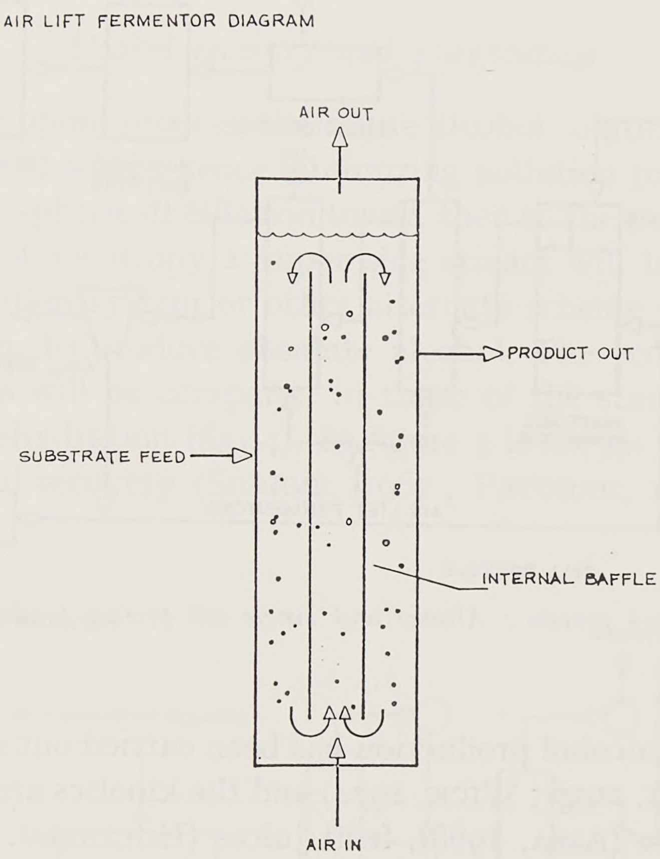



FIG. 5. — *Air lift fermentor diagram*

Another use of ethyl alcohol of great importance in Centralamerican countries could be its transformation to ethylene mainly for the utilization of this chemical in the plastics industries.

Single cell protein derived from the aerobic fermentation of molasses is produced nowadays at large commercial scale and many investigators (MOR, 1968 ; BERAN, 1969 ; WILKEN, 1972) are working to solve special problems involved in the fermentation step and in the yeast incorporation in food and feed. Yields achieved in either air lift or mechanical agitated fermentors are almost 100 p. 100 of the theoretical values and the protein obtained is of very high quality.

In the proposed process, the net balance from substrate to products (ethyl alcohol and SCP) could be intermediate between strictly anaerobic (high alcohol production, low cell mass concentration )and completely aerobic (high cell mass concentration and low alcohol production) ; operational conditions will be set by the process economics and will depend mainly on the market price and demand for both products.

As a net increased productivity of proposed process, glucose and pulp for paper could be produced. The enzymatic digestion of pretreated bagasse could be done using cellulase produced in the same integrated process by strains of fungi imperfecti locally isolated or coming from well known microorganisms like *Trichoderma viride* (MANDELS, 1971, 1974).

The cellulase enzyme system could be produced in the following way : the cellulotylic microorganisms (special strains obtained from different sources) will be grown continuously on a soluble sugar substrate (molasses) and the cell mass will be transferred to a second stage where enzyme induction occurs. In this fermentor a suitable inducer such as cellulose or cellobiose could be added in order to maximize cellulase production. After cell mass removal the enzyme solution could be used for bagasse saccharification.

Fibers of the inner part of cane plant, usually burned in actual process, could be transformed in the integrated process to pulp, using ethyl alcohol (produced in the same process) as the unique chemical for pulping (KLEINERT, 1974). Pulp produced could be utilized in paper manufacture to produce various types like printing paper, liner board.

## RÉSUMÉ

### DÉTAILS TECHNIQUES SUR UN PROCÉDÉ DE FABRICATION D'ALCOOL INDUSTRIEL A PARTIR DE CANNE A SUCRE

On présente un processus intégré qui produit à partir de la canne à sucre de l'alcool éthylique, des protéines d'organismes unicellulaires, des sirops de glucose et de la pulpe à papier. Ce procédé est comparé aux procédés habituels de production d'alcool de canne.

Le procédé proposé est intermédiaire entre une fermentation strictement anaérobie et un système complètement aérobie. Il permet une meilleure utilisation du sucre de la canne. Les paramètres de fabrication peuvent être fixés en tenant compte de la demande des divers produits et de leur prix.

## RESUMEN

### DETALLES TECNICOS ACERCA DE UN PROCEDIMIENTO DE FABRICACION DE ALCOHOL INDUSTRIAL POR MEDIO DE CAÑA DE AZUCAR

Se presenta en este artículo un proceso integrado que permite la producción, por medio de caña de azúcar, de alcoho etílico, de proteinas de organismos unicelulares, de jarabes de glucosa y de pasta con destino a la fabricación del papel. Este procedimiento puede ser comparado a los procedimientos habituales de producción de alcohol de caña.

El procedimiento propuesto constituye el término medio entre una fermentación estrictamente anaerobia y un sistema completamente aerobio y permite una mejor utilización de la caña. Los parámetros de fabricación pueden ser fijados teniendo debidamente en cuenta la demanda de los diversos productos y su precio.

## RIASSUNTO

### DETTAGLI TECNICI SU UN PROCEDIMENTO DI FABBRICAZIONE D'ALCOOL INDUSTRIALE A PARTIRE DALLA CANNA DA ZUCCHERO

Si tratta di un procedimento integrato che a partire dalla canna da zucchero permette di produrre dell'alcool etilico, delle proteine di organismi unicellulari, degliscíroppi di glucosio e della pasta da carta. Questo procedimento è confrontato ai procedimenti classici di produzione d'alcool di canna.

Il metodo proposto costituisce una via di mezzo tra una fermentazione strettamente anaerobica e un sistema completamente aerobio. Esso permette un miglior uso dello zucchero della canna. I parametri di fabbricazione possono essere fissati tenendo conto della richiesta dei diversi prodotti e del loro prezzo.

## REFERENCES

AIBA S. *et al.*, 1968. Kinetics of product inhibition in alcohol fermentation. *Biotech. Bioeng.*, **10**, 845-864.

AIBA S. *et al.*, 1973. *Biochemical Engineering*, 2nd Ed. University of Tokyo Press.

BERAN K., ZERMANOVA J., 1969. Cell growth and population activity of *Saccharomyces cerevisae* in two stage continuous cultivation. *Biotech. Bioeng.*, **2**, 853-862.

BORZANI W., AQUARONE E., 1957. Continuous fermentation. Alcoholic fermentation of blackstrap molasses. *Agr. Food Chem.*, **5** (8), 610-611.

Canadian Cane Equipment Ltd. Canada. Canadian Cane C-4 Separator Specifications, Edmonton, Alberta, Canada.

CLARK S. *et al.*, 1971. *Ethanol from renewable resources and its applications in automotive fuels and feasibility study.* House of Commons, Ottawa, Canada.

HAMER G., 1965. Stripping in sparged fermentation systems. I. Two component model systems. *Biotech. Bioeng.*, **7**, 199-214.

HAMER G., 1965. Stripping in sparged fermentation systems. II. The effect of operating temperature and gas phase pre-humidification in an ethanol water system. *Biotech. Bioeng.*, **7**, 215-217.

HOLZBERG I. *et al.*, 1967. A kinetic study of the alcohol fermentation of grape juice. *Biotech. Bioeng.*, **9**, 413-427.

HUGOT E., 1960. *Handbook of cane sugar engineering*, Elsevier Publishing Co.

ICAITI, 1973. *Informe sobre la situación del sector fabril productor de alimentos y bebidas en Centroamérica.*

KLEINERT T. N., 1974. Organosolv pulping with aqueous alcohol. *TAPPI*, **57** (8), 99-102.

MANDELS M. *et al.*, 1971. The use of adsorbed cellulase in the continuous conversion of cellulose to glucose. *J. Polymer Sci.*, Part C, (36), 445-459.

MANDELS M. *et al.*, 1974. Enzymatic hydrolisis of waste cellulose. *Biotech. Bioeng.*, **16**, 1471-1493.

MEADE G. P., 1964. *Spencer-meade cane sugar handbook.* 9th Ed. John Wiley.

MOR J. R., FIETCHER A., 1968. Continuous cultivation of *Saccharomyces cerevisae*. I. Under steady state conditions. *Biotech. Bioeng.*, **10**, 159-176.

PATURAU M. J., 1969. *By-products of the cane sugar industry.* Elsevier Publishing Co.

RODRIGUEZ BENITEZ V., 1968. *Continuous fermentation. Rum pilot plant.* Agr. Expt. Sta. U. P. R. Rio Piedas, Puerto Rico. Presented at 2nd Joint Meeting of the American Institute of Chemical Engineers and the Instituto de Ing. Quimicos de Puerto Rico. Tampa, Florida.

SHREVE R. N., 1967. *Chemical process industries.* 3rd Ed. McGraw-Hill Book Co.

SIECA, 1971. *Anuario Estadistico Centroamericano de Comercio Exterior.*

WICK E. *et al.*, 1974. Performance characteristics of continuous yeast alcohol fermentor with no mechanical stirring. *Biotech. Bioeng.*, **16**, (12), 1611-1631.

WILKEN T. O., 1972. Utilization of agricultural and industrial wastes by cultivation of yeasts. Proc. IV Inter. Ferment. Symp. *Ferment. Technol. Today*, 569-576.

*Ann. Technol. agric.*, 1975, **24** (3-4), 343-359.

# PRODUCTION D'EAUX-DE-VIE DE QUALITÉ EN CONTINU

J. MEJANE et J. PIQUOIS*

*Chaire de Distillerie, E. N. S. I. A.,*
*59 Douai*

* *Département Sucrerie Distillerie, S. E. U. M.,*
*62 Corbehem*

## RÉSUMÉ

Les auteurs rappellent les avantages et les inconvénients de la distillation des eaux-de-vie en alambic discontinu et en colonne continue. Ils recherchent quels dispositifs pourraient rassembler les avantages des deux techniques dans un même appareillage.

La conception générale du montage, la disposition d'organes annexes, peuvent permettre de construire une colonne réalisant certaines des conditions qui font la qualité des produits obtenus en alambic à repasses.

Un atelier expérimental en vraie grandeur a déjà été réalisé, et les résultats obtenus sont pleins de promesses. Sans dépense calorifique supérieure à celle d'une colonne classique, on améliore très sensiblement la qualité de l'eau-de-vie produite. Il est même possible de la rendre comparable à celle des produits obtenus dans des alambics discontinus dont les frais d'investissements et d'exploitation sont très largement supérieurs.

Les dispositifs décrits sont particulièrement applicables à la production de rhum agricole ou industriel, de rhum traditionnel ou de rhum léger, étant donnée la grande souplesse de réglage du système.

## INTRODUCTION

La qualité des eaux-de-vie est conditionnée par tous les facteurs mis en œuvre au cours de leur fabrication. Le terroir, le climat, la fermentation, la distillation, le vieillissement, etc., tout concourt à donner au produit ses caractères propres. Il faut bien admettre que, si fabriquer de l'alcool est une chose, élaborer une eau-de-vie de qualité est tout à fait autre chose. Dans le premier cas, l'objectif est de produire de l'éthanol, produit chimique ; dans le second, il faut rechercher la formation de saveurs et d'odeurs agréables et typiques dont l'alcool sera le véhicule. En cela,

les caractères des eaux-de-vie dépendent autant des phénomènes naturels que de l'Homme, de ses techniques, de ses goûts, de ses coutumes, en un mot de sa culture.

La distillation est une étape importante, et souvent décisive, dans cette élaboration, puisqu'elle a pour but de séparer le bon du moins bon et du mauvais, parmi les produits contenus dans le milieu fermenté.

## I. — LA DISTILLATION DES EAUX-DE-VIE

Il existe plusieurs techniques de distillation applicables aux eaux-de-vie. On peut les distinguer par le mode de chauffage, la forme des appareils mis en œuvre, mais aussi, et surtout, suivant que l'opération est conduite en discontinu (alambics) ou en continu (colonnes).

### *Distillation discontinue en alambic*

Rappelons que cette technique, à cause même de son principe, n'a pas un fort pouvoir séparateur du mélange alcool-eau. En effet, pour distiller tout l'alcool d'un vin à 10°GL par exemple, il faut théoriquement distiller dans les 60 p. 100 de la charge de la chaudière, ce qui conduit à un distillat de 17°GL, donc trop peu concentré pour constituer une eau-de-vie!

Dans ces conditions, il est nécessaire d'avoir recours à des artifices de conduite des appareils :

— On peut disposer sur le col de cygne de l'alambic un organe de condensation partielle des vapeurs émises par la chaudière. La vapeur non condensée, et qui gagne le coulage, se trouve ainsi enrichie en alcool. Si cette condensation partielle est importante (appareils à lentille ou à boule d'eau), on arrive à épuiser correctement les vins, tout en obtenant un degré acceptable pour une eau-de-vie dans le distillat. C'est ainsi que sont conçus les alambics dits « à premier jet ».

Le développement de la surface du col de cygne augmente le rayonnement calorifique, donc provoque une condensation partielle, ce qui augmente le degré du distillat. Ce développement de la surface est relativement facile car le cuivre rouge, métal traditionnel pour les alambics, se chaudronne bien, et les artisans constructeurs ont souvent recherché pour les cols de cygne des formes artistiques : tête de Maure, bulbe d'oignon, etc.

— On peut encore effectuer des repasses du distillat obtenu. Ces distillations successives peuvent donner lieu à la confection de lots dans les distillats, de manière à classer les produits. Ainsi on pourra réserver le lot contenant les produits les meilleurs pour constituer l'eau-de-vie, et retraiter les lots de moins bonne qualité pour en affiner la composition. La méthode dite « charentaise » applique ce procédé avec quelques variantes dans les détails et la voici très sommairement résumée d'après LAFON *et al.* (1972).

La distillation s'effectue en deux temps.

On charge la chaudière de vin à distiller, on chauffe et on recueille au coulage du distillat :

— des têtes qui seront repassées mélangées au vin de l'opération suivante : Ce tirage est limité à quelques litres ;

— un brouillis constitué par la majeure partie du distillat et qui titre 25 à 30°GL ; c'est ce brouillis qui sera repassé à l'opération suivante ;
— des queues, constituées par la fin de distillation, coulant à faible degré et qui seront repassées dans du vin ultérieurement.

La « bonne chauffe », ou deuxième temps de la distillation, consiste à charger la chaudière de brouillis lorsque le volume obtenu par plusieurs distillations semblables à la précédente est suffisant. On recueille alors dans le distillat :
— des têtes 1 à 2 p. 100 que l'on remettra dans des vins ou brouillis d'opérations ultérieures ;
— la bonne eau-de-vie constituée par le distillat jusqu'à 58°GL environ. C'est ce lot qui constitue l'eau-de-vie de qualité ;
— des queues ou « secondes » qui seront remélangées à des vins ou brouillis à traiter ultérieurement.

Le « savoir faire » du distillateur consiste à « couper » correctement entre le coulage de la bonne eau-de-vie et le coulage des secondes.

Plusieurs variantes sont possibles dans le recyclage des têtes, des secondes et des queues. Par exemple, le repassage des secondes dans le vin est une opération plus onéreuse, mais donne des produits d'une grande finesse.

### *Distillation continue en colonne*

Inutile de décrire le principe et la marche d'une colonne à distiller. Qu'il suffise de rappeler que pour un nombre donné de plateaux d'épuisement (supérieur au nombre minima théorique) on peut épuiser l'alcool d'un vin en réglant le flux calorifique de chauffage à la base de la colonne.

De même, pour un flux calorifique donné entrant dans la colonne de concentration, et provoquant la rétrogradation, le degré alcoolique du distillat ne dépend que du nombre de plateaux de concentration (pourvu que la rétrogradation soit supérieure à un minima théorique) (PÉRARD).

Or les vapeurs alcooliques à bas ou moyen degré sont « autoconcentrables », c'est-à-dire qu'elles contiennent suffisamment de calories pour assurer la rétrogradation minimale. Elles peuvent donc se concentrer jusqu'à un degré qui ne dépend que du nombre de plateaux qu'elles ont à escalader. On conçoit que ce mode de distillation puisse être utilisé non seulement pour la production d'alcools industriels à haut degré, mais aussi pour des eaux-de-vie à moyen degré, puisque dans ce cas il suffit de limiter le nombre des plateaux de concentration.

### *Examen critique général de la distillation en alambic et de la distillation en colonne pour la production d'eaux-de-vie*

La distillation continue en colonne présente des avantages techniques certains. D'abord la continuité permet d'organiser une régulation plus ou moins poussée de l'opération. A la limite, l'atelier peut devenir à marche automatique, et ne pas nécessiter la présence continuelle d'un personnel très qualifié.

En continu, des récupérations calorifiques sur les effluents permettent, en général, de porter gratuitement le vin à l'ébullition, ou presque. La dépense de chauffage

est alors relativement faible, beaucoup plus faible que dans le cas des alambics. Il faut cinq à six fois moins de calories et cet avantage est d'autant plus appréciable que le prix du combustible est élevé.

Enfin une colonne permet de traiter de grandes quantités horaires, diminue les freintes et les risques de fause manœuvre, permet de confectionner des lots importants homogènes.

Dans ces conditions, pourquoi utiliser encore des alambics et le procédé par repasses successives ? Tout simplement parce que, avec les mêmes matières premières, les eaux-de-vie produites en alambic discontinu à repasses sont bien meilleures que celles produites en colonne. Ce gain de qualité justifie tous les inconvénients des repasses : dépense calorifique importante, risque de freintes, « savoir faire » du distillateur, débit limité, etc. Ce procédé est imposé par la réglementation des eaux-de-vie les plus prestigieuses et recommandé dans tous les cas où l'on recherche la qualité.

Le remplacement d'alambics par des colonnes a souvent entraîné une détérioration sensible des qualités organoleptiques du produit. Cependant pour certaines productions, celle du rhum par exemple, des contraintes de prix et de quantité à élaborer ont imposé l'emploi de colonnes et fait réserver l'emploi des alambics à des cas très exceptionnels (ANDRES, 1970).

Est-il possible d'expliquer cet échec des colonnes en matière de qualité ? Si oui, peut-on modifier les dispositifs de la colonne classique pour améliorer l'eau-de-vie produite ? Divers auteurs ont proposé des aménagements plus ou moins partiels et dont les résultats n'ont pas toujours été très positifs (MARILLIER, 1925 ; KERVEGANT, 1946).

Nous avons essayé de copier en version colonne continue les phénomènes du discontinu à repasses, pour conserver autant que possible les avantages des deux techniques.

## II. — QUELQUES RAISONS DE CETTE DIFFÉRENCE DE QUALITÉ

### *Pourquoi les eaux-de-vie produites en alambic sont-elles meilleures?*

A quoi sont dues les qualités des eaux-de-vie produites en alambic ? A de nombreuses causes dont nous avons retenu, entre autres, les suivantes :

*Sélection des produits volatils.*

Contrairement à ce que l'on pourrait penser, la confection de lots de distillat et les repasses entraînent une sélection des produits analogue à une rectification. Cependant, cette sélection est effectuée tout au long des deux distillations successives. On ne peut comparer qu'avec beaucoup de prudence cette opération et le classement des produits dans une colonne rectificatrice continue.

De nombreux essais en appareil continu n'ont pas été couronnés de succès : ou bien le fractionnement est faible et des impuretés désagréables ne sont pas séparées de l'eau-de-vie, ou bien le fractionnement est trop poussé et on élimine de l'eau-de-vie des constituants qui lui confèrent des qualités aromatiques (LAFON *et al.*, 1972).

*Durée de l'opération.*

La distillation en alambic dure très longtemps, et particulièrement la bonne chauffe qui doit être conduite très lentement pour obtenir des produits de qualité. Par contre, en colonne continue, la distillation ne dure que quelques minutes. Dans ces conditions, la formation de produits aromatiques par réactions lentes a le temps de s'effectuer de façon appréciable dans l'alambic, alors qu'elle est très faible ou même nulle dans une colonne à distiller. L'alambic apparaît donc, non seulement comme un appareil de distillation, mais aussi comme un « réacteur », fonction pratiquement nulle pour une colonne à distiller.

Dans une opération discontinue, l'évolution des divers éléments de marche s'effectue dans le temps, alors que dans un appareil continu cette évolution a lieu dans l'espace. Le régime permanent réduit à des temps très courts certaines réactions qui, de ce fait, n'ont pas le temps de s'effectuer de façon appréciable. Remarquons également que le classement en divers lots est une opération très souple. Il peut être modifié ou remis en question à chaque opération, ce qui permet de modeler presque à volonté la qualité de l'eau-de-vie obtenue.

*Tirage des têtes.*

Le recyclage des têtes pourrait n'être considéré que comme un simple report d'une opération à l'autre. Cela n'est pas tout à fait exact. Si les têtes de première chauffe, d'ailleurs pas toujours tirées, ne subissent que peu de modifications, les têtes de bonne chauffe sont nettement améliorées par leur contact avec l'air qui provoque des oxydations bénéfiques. Nous montrerons ci-dessous que cette amélioration n'est pas négligeable et peut être contrôlée.

*Les queues ou « secondes ».*

Elles sont, certes, recyclées également dans des distillations ultérieures, mais cette opération n'est pas non plus un simple report, puisqu'elles apportent des éléments qui permettront à des produits de qualité de se former sous l'action de la température, de l'acidité, de l'alcool, notamment par estérification.

### *Pourquoi les colonnes classiques donnent-elles des eaux-de-vie moins bonnes que les alambics?*

Nous venons d'exposer quelques aspects, parmi bien d'autres, qui tentent d'expliquer pourquoi les colonnes classiques ne permettent pas d'obtenir des eaux-de-vie d'aussi bonne qualité que celles obtenues en alambic.

Si quelques auteurs ont tenté de concevoir des colonnes comportant des accessoires ou des circuits destinés à éliminer des dégoûts ou à provoquer la formation de certains constituants favorables, nous n'avons pas connaissance de la recherche d'une solution d'ensemble. L'atelier de distillation continue pour eau-de-vie est encore traité de nos jours par la plupart des constructuers comme s'il s'agissait de produire de l'alcool. C'est ainsi que des livraisons récentes garantissent des productions horaires, des dépenses de vapeur, des surfaces d'échangeur, etc. éléments calculés en fonction de critères relatifs à l'alcool seulement. Selon nous, ces garanties devraient passer, dans une certaine mesure, au second plan.

Une colonne à eau-de-vie doit être conçue non pas uniquement pour distiller de l'alcool, mais pour élaborer un produit de qualité, ce qui veut dire que sa « fonction réacteur » est tout aussi importante, voire prépondérante sur sa fonction distillation.

Nous avons surtout recherché dans la conception de l'appareillage qui va être décrit à préserver cette fonction « réacteur ».

## III. — NOUVELLE COLONNE SPÉCIALE A EAUX-DE-VIE

### *Conception générale*

Les dimensions fonctionnelles d'une colonne à distiller sont déterminées de façon de plus en plus précise grâce à des calculs mettant en jeu les conditions d'équilibre, les vitesses des fluides, les pertes de charge, etc. Les colonnes à alcool bien conçues présentent les côtes optimales pour assurer un service donné. En général, on recherche une production maximale pour une dépense calorifique et un coût de construction minimal. Ces considérations entraînent que la vitesse des fluides est très rapide, donc que le temps de séjour moyen est très court.

Quant au nombre de plateaux, il est déterminé en fonction du taux de chauffage (et de rétrogradation), de manière à optimiser la dépense d'installation proportionnelle au nombre de plateaux et la dépense de chauffage inversement proportionnelle à ce nombre.

Ces références doivent, selon nous, passer au second plan lorsqu'on veut concevoir une colonne à eau-de-vie. Le temps de séjour moyen des fluides sur les plateaux ou dans tout élément de l'atelier doit être pris en considération principale.

### *Nombre de plateaux*

On sait qu'il existe plusieurs solutions pour effectuer une opération donnée à l'aide d'une colonne à distiller en considérant des valeurs conjuguées équivalentes : nombre de plateaux — taux de chauffage.

Les deux solutions extrêmes sont les suivantes :

— nombre de plateaux très faible voisin du minimum théorique et chauffage très important, théoriquement infini pour le nombre minimal de plateaux ;
— nombre de plateaux infini pour un chauffage minimal théorique.

En principe, toute solution intermédiaire convient et c'est à ce niveau que le choix de l'une d'entre elles peut être dicté par des considérations économiques (cas de la production d'alcool) ou par des considérations de qualité (cas de la production d'eau-de-vie).

Pour une colonne à eau-de-vie, un nombre de plateaux élevé paraît préférable dans la mesure où cette disposition augmente le temps de séjour dans l'appareil. Elle augmente surtout le temps d'ébullition du vin à degré alcoolique encore appréciable (réactions utiles) puisque la répartition d'équilibre de l'alcool se prolonge assez bas dans les plateaux d'épuisement. Le taux de chauffage peut alors être assez faible mais cette considération doit passer, nous l'avons vu, au second plan.

Que penser alors de certaines colonnes construites pour produire du rhum à partir de vin à 7°-8°GL, souvent d'ailleurs alimentées à degré plus faible, et qui n'ont que 14 ou 15 plateaux d'épuisement ? Ce nombre de plateaux est assez proche du minimum théorique et il faut beaucoup de vapeur pour épuiser correctement les vinasses : 290 kg par hl d'alcool pur pour des vins à 6,5°, 460 kg par hl d'alcool pur pour des vins à 4°. Cette conception est parfaitement logique pour le constructeur qui considère que la vapeur produite à partir de la bagasse est très bon marché, mais ces colonnes sont des colonnes à alcool et non à eau-de-vie suivant nos critères.

Il en est de même pour la partie concentration. A taux de chauffage élevé, donc avec une rétrogradation importante, il suffit de quelques plateaux de concentration pour atteindre des degrés élevés, et aucun modelage de la composition du distillat n'est possible par réglage de la charge de la colonne. D'ailleurs il existe une relation fonctionnelle entre le nombre de plateaux de concentration et le nombre de plateaux d'épuisement d'une colonne. Cette liaison fonctionnelle est effectuée par le flux de chauffage. C'est ainsi que PERARD appelle « colonnes rationnelles » les colonnes dont le nombre de plateaux d'épuisement et le nombre de plateaux de concentration sont judicieusement choisis en fonction du taux de chauffage et du degré du coulage à obtenir. Le choix d'un rapport rationnel entre ces nombres fait intervenir la température à laquelle est faite l'alimentation en vin, le degré désiré au coulage et dépasserait le cadre du présent exposé.

Signalons simplement que beaucoup de colonnes nous paraissent irrationnelles : dans ces appareils, ou bien on épuise correctement les vinasses, mais alors on coule un distillat à degré trop élevé ; ou bien on règle le coulage à un degré souhaitable et les vinasses sont mal épuisées. Pour pallier à cet inconvénient, certaines colonnes comportent des dispositifs permettant de by-passer certains plateaux de concentration, dispositifs dans lesquels on a voulu voir, à tort, une possibilité d'amélioration de la qualité, alors qu'ils ne correspondent principalement qu'à une facilité de réglage.

En résumé, les colonnes à eaux-de-vie doivent être conçues pour un taux de chauffage faible, ce qui implique un grand nombre de plateaux d'épuisement (de l'ordre de 20 au moins pour des vins à degré alcoolique courant : 8 ou 10°GL.). De ce fait, le nombre de plateaux de concentration doit être également relativement élevé (voir discussion ci-dessous) et surtout en relation « rationnelle » avec le nombre de plateaux d'épuisement.

### *Dimensions horizontales d'une colonne*

Il s'agit essentiellement du diamètre et du profil des plateaux. Le diamètre d'une colonne est déterminé en considérant la vitesse ascensionnelle de la vapeur qui la parcourt.

On connaît des vitesses ascensionnelles maximales admissibles, tenant compte de l'écartement des plateaux et du poids spécifique des vapeurs. Une colonne économique sera donc conçue en calculant sa section de manière que la vitesse ascensionnelle des vapeurs reste partout légèrement inférieure à la vitesse maximale admissible. On voit que cette considération rend le séjour des fluides le plus court possible, ce qui est contraire aux objectifs définis ci-dessus dans le cadre de la production d'eaux-de-vie.

D'autre part, la réalisation des plateaux a une importance. La quantité de liquide sur un plateau, ou « holp up », devrait être la plus importante possible pour augmenter le temps de séjour ce qui, dans un autre ordre d'idée, a une influence sur la stabilité de marche. Or, les plateaux à cheminées et calottes semblent mieux se prêter à la réalisation de ces objectifs. On utilise cependant encore des plateaux à clapets ou à perforations qui nous semblent peu adaptés à la production d'eaux-de-vie de qualité. Dans ces plateaux, la vitesse ascensionnelle des vapeurs est un paramètre important pour l'équilibre du liquide. Cette contrainte dynamique est très gênante.

Pour la même performance, une colonne peut être construite avec de larges intervalles entre plateaux et une vitesse ascensionnelle des vapeurs importante, ou avec de faibles intervalles entre plateaux et une vitesse ascensionnelle faible. Dans le premier cas, elle sera haute et étroite donc d'allure élancée ; dans le second cas, pour le même débit, elle sera moins haute et plus large, donc d'allure trapue. Il semble qu'au cours de ces dernières années les constructions se soient orientées, pour des raisons économiques, plutôt vers des colonnes hautes et étroites, ce qui ne rejoint pas très bien les conditions souhaitables pour les temps de séjour. De même, la charge en liquide de chaque plateau devrait être importante, alors que l'on recherche souvent un « hold up » faible, provoquant moins d'inertie dans les réglages.

Dans nos estimations, et d'après les résultats pratiques obtenus, nous jugeons raisonnable de réduire au quart ou au 1/5 les vitesses ascensionnelles communément adoptées pour l'alcool. Cela revient à dire que pour une bonne colonne à eau-de-vie, le diamètre doit être environ multiplié par deux par rapport à celui d'une colonne à alcool de même débit. Le volume du liquide sur le plateau est souvent environ de 1/30 du débit et nous estimons que ce volume peut être facilement triplé ou quadruplé en jouant sur la hauteur des trop pleins.

Enfin, le modèle de plateau à barbotage par calottes nous paraît préférable à tout autre dispositif.

### *Soubassement ou fond de colonne*

La longue durée de l'ébullition à moyen ou très bas degré dans la chaudière de l'alambic permet à certaines réactions bénéfiques de se produire. Ces réactions sont souvent lentes et consistent soit en estérification d'acides et d'alcools à poids moléculaire relativement élevés, soit en réactions de Maillard développant des arômes. Le soubassement de la colonne doit alors représenter un temps de séjour suffisant et doit donc être largement développé en volume.

Toutefois, nous avons constaté qu'une trop longue ébullition des vinasses pouvait entraîner la formation de mauvaises odeurs (odeur de marais, par exemple) ce qui nous a conduit à contrôler ce temps de séjour par un bon balayage méthodique du soubassement. En outre, on peut régler facilement son volume utile par l'extraction des vinasses à divers niveaux. Cette longue ébullition dans les zones où se rassemblent des acidités indésirables provoque la formation de savons de cuivre comme l'indique LAFOND *et al.* (1972) pour les alambics discontinus. La construction de tout l'atelier en cuivre rouge s'impose donc, même pour les parties d'épuisement que certains voudraient réaliser en acier inoxydable. Un dispositif de nettoyage doit être prévu, soit par un trou de visite de diamètre suffisant, soit par tout autre moyen.

### *La pasteurisation*

La distillation en deux temps a pour avantage de refaire bouillir le brouillis. Il est possible dans une certaine mesure de copier cette opération dans une colonne.

En effet, l'eau-de-vie coulant après le chauffe-vin et le condenseur de la colonne peut être réintroduite sous forme de rétrogradation au sommet de celle-ci et être tirée sous forme de liquide bouillant deux ou trois plateaux plus bas. Ce dispositif n'est autre que la pasteurisation dont on connaît les effets bénéfiques. Le coulage étant prélevé bouillant, ne peut contenir de gaz dissous indésirables. Ces gaz s'accumulent dans le condenseur et une partie s'échappera finalement par la trompette, une autre partie saturera les têtes dans le réfrigérant, mais ces têtes seront traitées pour les priver de cette charge nuisible comme indiqué ci-dessous.

Reconnaissons que, contrairement à la redistillation des brouillis en alambic, la pasteurisation ne peut reproduire qu'une durée de traitement relativement courte. En effet, la réébullition ne dure que quelques minutes. Il serait possible de concevoir un autre élément de colonne essayant de reproduire plus précisément l'opération de la bonne chauffe, mais l'atelier deviendrait vite très compliqué et perdrait les avantages de la distillation en colonne.

### *Traitement des tirages de têtes*

Nous avons vu ci-dessus que dans l'alambic à repasses, on tire des têtes de première chauffe et des têtes de bonne chauffe qui sont réintroduites dans le vin d'opérations ultérieures. Dans une colonne, il est possible d'imiter cette manœuvre de la manière suivante.

Le vin arrivant en colonne parcourt d'abord deux ou trois plateaux qui ne sont pas chauffés par le flux total des vapeurs ascensionnelles. Sur ces plateaux, le vin atteint la température d'ébullition s'il n'y est déjà, et reçoit un très faible barbotage réglable à volonté. Il se décharge des gaz dissous, des mauvaises odeurs de têtes qu'il suffit de condenser et de couler par un faible tirage à travers une petite éprouvette.

De même, par le jeu de la pasteurisation que nous avons décrit dans le paragraphe précédent, le sommet de la colonne permettra, par un faible coulage également, de séparer des têtes correspondant aux têtes de bonne chauffe de l'alambic. Le recyclage de ces têtes dans le vin ne présente aucune difficulté, mais si on effectuait ce recyclage immédiatement, on ne mettrait pas à profit l'amélioration de la qualité dont elles sont l'objet par oxydation sous l'effet de l'air. Nous avons étudié ce phénomène, tant au laboratoire que sur diverses colonnes, et publié par ailleurs des résultats sur la solubilité de l'oxygène de l'air dans les liquides alcooliques (MEJANE *et al.*, 1973), et sur la présence d'acide sulfurique dans les alcools (MEJANE, 1963).

L'oxydation de divers composés sous l'effet de l'air est très difficile dans un vin alcoolique et pratiquement toujours incomplète dans des conditions de temps acceptables. Par contre, si ces produits oxydables sont volatils et extraits du vin sous la forme d'un liquide alcoolique, le fort pouvoir réducteur du vin ne s'oppose plus à une oxydation relativement facile par l'air. C'est ainsi qu'en présence de cuivre il suffit de 150 minutes d'aération très modérée pour oxyder complètement tous les composés gênants ou indésirables. Les têtes peuvent donc avantageusement être aérées dans un petit réacteur avant d'être réintroduites dans le vin. Ainsi, les composés

contenant du soufre réduit sont oxydés et donnent une acidité sulfurique, de même des composés gazeux malodorants (amines) sont transformés en produits qui ne sont plus volatils. Le dispositif d'oxydation est fort simple : il suffit de faire parcourir par les têtes un récipient rempli de tournure de cuivre et recevant un courant d'air modéré. Le volume utile est calculé pour donner un temps de séjour suffisant. Le traitement est effectué à froid, bien entendu, et en continu.

*Classement des moyens goûts ou secondes*

Dans le montage décrit jusqu'à présent, rien ne permet d'isoler ou de recycler une fraction correspondant aux secondes de la bonne chauffe.

Dans la colonne de concentration, s'effectue un classement des composants volatils du vin suivant leur coefficient de volatilité relative par rapport à l'alcool. C'est ainsi que certains constituants s'accumulent plus particulièrement sur les plateaux qui titrent 45-50°GL, comme l'alcool amylique, par exemple. Ces constituants ne pourront gagner le coulage que si celui-ci n'est pas séparé de cette zone d'accumulation par de trop nombreux plateaux à fort degré, et que si l'accumulation, elle-même, devient assez importante dans le temps. On conçoit donc que l'on puisse contrôler le passage dans l'eau-de-vie de tels produits de deux façons.

D'abord on coule à relativement haut degré, ce qui est possible en modifiant le point de coulage sur la partie de concentration de la colonne. Plus ce coulage sera prélevé vers les plateaux supérieurs, plus son degré sera élevé et moins il contiendra d'alcool amylique et de moyens goûts. Au contraire, si le coulage est prélevé sur un plateau inférieur, moins son degré sera élevé et plus il sera chargé en non-alcool lourd.

D'autre part, on peut effectuer un tirage latéral au niveau du plateau 45-50°GL pour décharger cette partie de la colonne en produits qui s'y rassemblent. Le taux de ce tirage, bien que faible, empêchera toute concentration excessive et donc un passage intempestif dans le coulage d'eau-de-vie. Bien entendu, ce tirage latéral pourra être réintroduit dans les vins où il provoquera une estérification, donc la formation de non-alcool de qualité.

*Chauffage de la colonne*

Une colonne peut être chauffée par une injection directe de vapeur ou par surface. Nous savons que le chauffage à feu nu des alambics est considéré par certains comme un facteur important de la qualité de l'eau-de-vie. Mais, la production en colonne concernant surtout des débits assez importants, il serait nécessaire de prévoir des surfaces de chauffe bien adaptées aux dimensions de l'appareil et aux quantités calorifiques à transmettre, avec souvent un très mauvais rendement.

La vapeur de chauffage transporte souvent de mauvaises odeurs qui risquent de gravir toute la colonne et d'affecter le coulage. Cet inconvénient peut être évité par l'emploi d'un bouillisseur ou d'un serpentin. D'ailleurs, en injection directe, la vapeur dilue les vinasses, ce qui a pour défaut de ralentir des réactions favorables. En outre, l'ensemble qui vient d'être décrit exige une bonne stabilité de marche pour que les classements attendus puissent s'effectuer correctement et que les tirages et recyclages exécutés représentent bien les effets que l'on attend d'eux. Or la régulation est

beaucoup plus facile à obtenir par chauffage à la vapeur que par un chauffage à feu nu.

Dans ces conditions, et pour une colonne, le chauffage à la vapeur et par surface nous paraît en définitive préférable.

### *Régulation de l'installation*

La marche de l'ensemble étant continue, il est très facile d'installer les régulations classiques pour ce genre d'atelier : régulation de chauffage par prise d'impulsion de pression et régulation de coulage par prise d'impulsion de température sur le plateau sensible. Insistons encore sur la grande utilité d'une bonne régulation provoquant une marche bien stable de l'atelier, dans la mesure où cette stabilité permet aux phénomènes décrits de se dérouler dans l'espace à l'endroit où ils sont prévus.

### *Chambrage des vins*

L'action combinée de la température et de la durée sur les vins est considérée comme bénéfique dans la mesure où ont lieu des estérifications et autres réactions améliorant la qualité.

Bien entendu, le système décrit ci-dessus permet sans difficulté de mettre en place un chauffe-vin continu. Mais ce chauffe-vin ne remplit pas forcément les exigences de durée qui seraient souhaitables. Il suffit alors de prévoir une capacité que nous appellerons « chambrage des vins » dont le volume utile commandera la durée moyenne. Ce chambrage peut être contrôlé en température par un chauffage accessoire. La réintroduction des têtes ainsi que des prélèvements latéraux dans les vins s'effectuera avantageusement avant le chambrage puisque l'augmentation du titre alcoolique favorise les réactions recherchées.

Nous avons même essayé en variante de réaliser un « chambrage forcé » des vins. Pour cela, le chambreur des vins était constitué par un récipient sous pression muni d'un serpentin de chauffage permettant d'atteindre jusqu'à 110°C. L'appareil sous pression reçoit le vin à chambrer par gravité d'une hauteur de 15 mètres assurant ainsi une pression de l'ordre de 1,5 bars. Le vin chambré, surchauffé, peut ensuite gagner l'alimentation de la colonne soit à travers un détendeur (il rentre alors partiellement vaporisé), soit à travers un réfrigérant et un robinet de contrôle, à sa température d'ébullition sous pression atmosphérique. Bien que ces essais de chambrage forcé n'aient pu être exécutés que de façon temporaire, nous avons pu constater qu'ils avaient une influence très sensible sur la qualité de l'eau-de-vie et particulièrement sur la formation des esters. C'est ainsi que pour une eau-de-vie provenant d'un vin de raisin, les esters sont passés en moyenne de 60 à 150 g par hectolitre d'alcool pur avec un chambrage de 30 minutes à 98°C.

## IV. — RÉALISATION PRATIQUE ET PREMIERS RÉSULTATS OBTENUS

### *Description de l'atelier*

Un atelier de distillation pour eaux-de-vie fines a été réalisé suivant les conceptions décrites ci-dessus. Le principe de montage est figuré par le schéma de la figure 1.

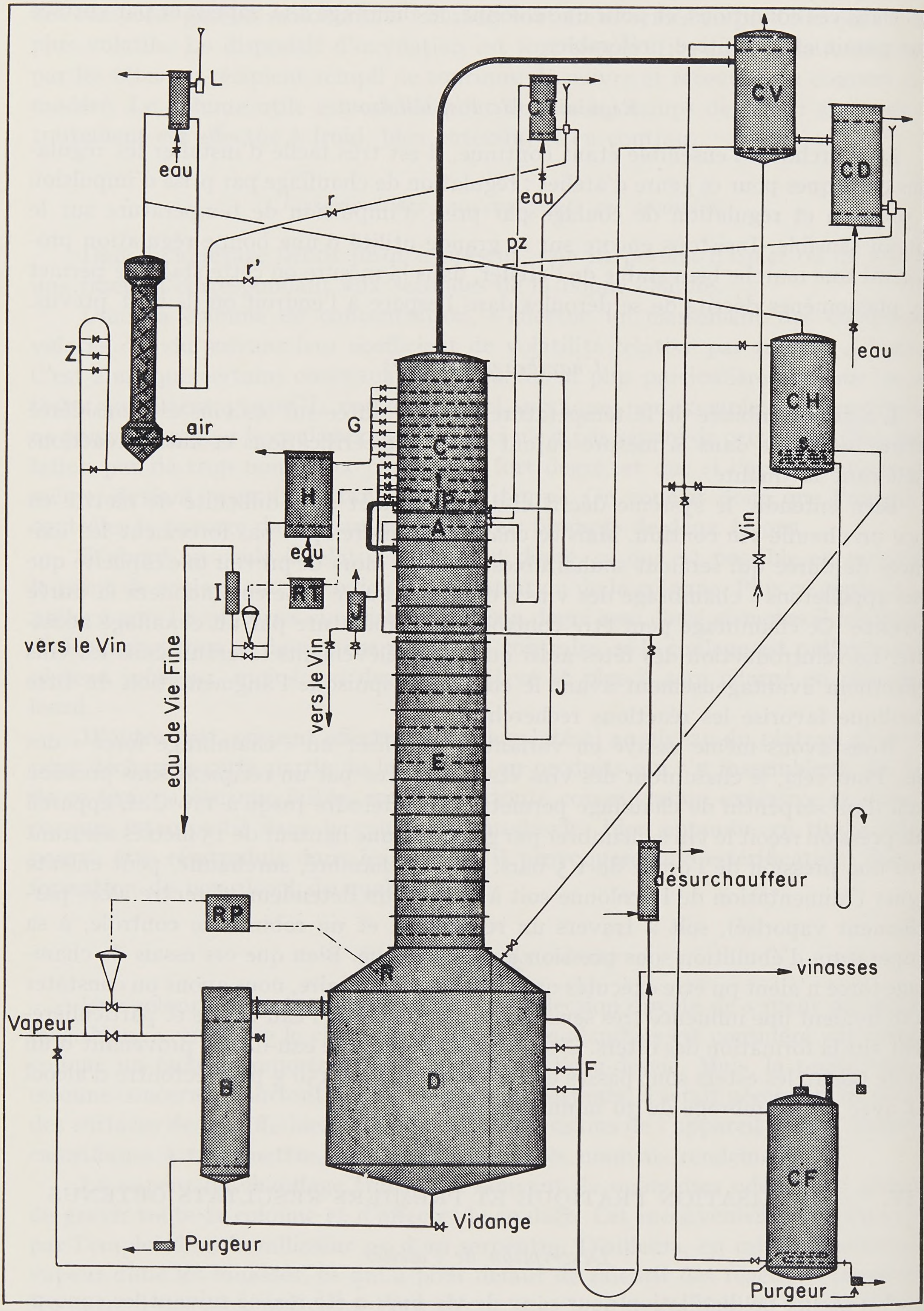



Fig. 1. — *Schéma d'un atelier de distillation pour eau-de-vie fine*

On y reconnaît la colonne à distiller constituée de ses plateaux d'épuisement E et des plateaux de concentration C. Les deux plateaux de dégazage des vins A sont séparés de C par un joint plein JP.

Ces plateaux et le diamètre général de la colonne ont été calculés comme indiqué précédemment.

Le soubassement D présente un volume utile important correspondant à un temps de séjour approprié. Le dispositif de tirages de vinasses F permet de faire varier le niveau de celles-ci, donc leur volume dans le soubassement, et par suite le temps de séjour.

Le bouillisseur de chauffage B fonctionne latéralement en thermo-siphon et son taux de circulation est très élevé. Il fonctionne en bouillisseur dynamique lorsque le niveau des vinasses est fixé relativement bas, par le jeu des tubulures F.

La régulation de pression RP agit sur la vapeur de chauffage arrivant au bouilllisseur.

Le chauffe-vin CV reçoit les vapeurs issues de la colonne de concentration C et le vin réchauffé gagne le chambreur CH dont le volume utile commande un temps de séjour approprié. Le vin gagne ensuite le plateau d'alimentation, après avoir traversé les plateaux A chargés de le dégazer et d'isoler les têtes. La température de chambrage dans CH peut être contrôlée dans une certaine mesure par un prélèvement de vapeur de vinasses (à 100°C) venant parcourir un serpentin *s*.

Si le chambreur CM émet quelques vapeurs ou gaz alcooliques, ils sont dirigés vers un réfrigérant L dont nous préciserons le rôle ci-dessous. En variante, est représenté un chambrage forcé CF constitué par un récipient muni de soupapes recevant le vin déjà préchauffé dans le chauffe-vin sous une hauteur barométrique de 15 mètres environ. Ce vin après un séjour, fonction du volume de CF, à haute température peut gagner le plateau d'alimentation à travers un réfrigérant pour le désurchauffer.

Les têtes issues des plateaux A sont dirigées vers un condenseur réfrigérant CT. Leur coulage et leur débit sont commandés par un papillon de réglage *p* et un robinet de coulage *r*.

Le coulage de l'eau-de-vie est effectué par l'un des tirages latéraux G vers le réfrigérant de coulage H, le débit-mètre de coulage I. Un régulateur de température RT commande ce coulage par prise d'impulsion de température dans la zone sensible de la colonne de concentration. Le choix d'un des robinets G pour le prélèvement du coulage d'eau-de-vie est commandé par la qualité à obtenir comme nous l'avons expliqué ci-dessus. Le condenseur CD finit de condenser éventuellement les vapeurs alcooliques qui ne l'auraient pas été dans le chauffe-vin. La bouteille de coulage de ce condenseur CD permet d'une part le coulage de têtes à travers un robinet de réglage R′, et d'autre part la rétrogradation sur la colonne C.

Les têtes provenant du condenseur CT (têtes de première chauffe) et les têtes provenant du condenseur CD (têtes de deuxième chauffe) sont réunies pour être aérées dans un cylindre vertical K, rempli de tournure de cuivre et recevant une injection d'air à la base. L'air qui s'échappe de cet aérateur est refroidi dans un petit réfrigérant L, qui rétrograde sur K, pour retenir éventuellement les pertes d'alcool. Le temps de séjour moyen dans K est commandé par la hauteur du siphon de sortie. Ces têtes aérées sont réintroduites dans le vin.

Enfin, un tirage latéral sur quelques plateaux à la base de la colonne C est refroidi dans un réfrigérant latéral J pour constituer les moyens goûts (secondes) à recycler

dans le vin. Ce tirage dégorge la colonne C et limite le passage de produits relativement lourds dans le distillat (acides, alcools supérieurs). Ces produits provoqueront des estérifications dans le vin.

*Résultats obtenus*

Voici quelques résultats obtenus lors de l'exploitation de ce type d'atelier, résultats qui montrent que les classements escomptés s'effectuent correctement et qu'il est possible de modeler dans une bonne mesure la composition de l'eau-de-vie.

a) *Distillation de vin de raisin à 9,65°.*

— Effet du chambreur CH :

| | Degré | Acidité | Esters | Alc. sup. |
|---|---|---|---|---|
| Eau-de-vie sans chambrage | 59,5° | 28,0 | 97,8 | |
| Chambrage : 1 h à 84°C | 60,6° | 29,2 | 100,6 | |
| Chambrage : 1 h à 88°C | 58,5° | 26,9 | 112,5 | |

— Choix du tirage latéral pour le coulage de l'eau-de-vie :

| | Degré | Acidité | Esters | Alc. sup. |
|---|---|---|---|---|
| Tirage vers les plateaux supérieurs de C. | 76,75° | 9,4 | 109,3 | 282 |
| Tirage vers les plateaux inférieurs de C. | 56,7° | 29,6 | 94,0 | 441 |

— Dépense de vapeur pour le vin à 9,65° arrivant à l'atelier à 9°C, sur 48 heures, mise en route et arrêts compris : 36 litres de fuel domestique par hectolitre d'alcool pur.

— Perte totale : 0,25 p. 100 de l'alcool total mis en œuvre.

b) *Distillation de vin de raisin à 8,6°.*

— Effet du degré de coulage sur la composition par le choix de la tubulure de coulage de l'eau-de-vie :

| | Dérivés soufre | Acidité | Esters | Alc. sup. |
|---|---|---|---|---|
| Coulage à 53,4° (tubulure basse) | Néant | 36,7 | 72,5 | 360 |
| Coulage à 58,1° (tubulure moyenne) | Néant | 29,4 | 89,4 | 345 |
| Coulage à 62,2° (tubulure haute) | Néant | 21,9 | 75,5 | 326 |
| Même vin distillé en colonne traditionnelle (58°) | Présence | 25,4 | 45,8 | 390 |

c) *Distillation de vin de raisin à 10,2°.*

— Effet du chambrage forcé :

| | Degré | Acidité | Esters |
|---|---|---|---|
| Coulage sans chambrage (alimentation directe après le CV) | 56,0° | 25,9 | 61,2 |
| Chambrage forcé : 2 h à 90° | 59,3° | 21,6 | 65,6 |
| Chambrage forcé : 4 h à 95° | 58,5° | 23,4 | 114 |
| Chambrage forcé 30 minutes à 98° avec recyclage des têtes aérées | 59,1° | 21,6 | 154,8 |

— Effet du tirage latéral de moyen goût avec coulage toujours au même niveau de la colonne C :

| | Degré | Acidité | Esters | Alc. sup. |
|---|---|---|---|---|
| Sans tirage latéral | 59,05° | 20,6 | 51,7 | 469 |
| Tirage latéral de 2 p. 100 de l'alcool pur vers 40°GL | 57,8° | 26,8 | 63,3 | 431 |
| Tirage latéral de 4 p. 100 de l'alcool pur vers 40°GL recyclage dans les vins | 59,3° | 21,6 | 64,6 | 376 |
| Tirage latéral de 5 p. 100 de l'alcool pur vers 40°GL et recyclage dans les vins | 58,5° | 26,4 | 68,5 | 341 |

— Dépense de fuel domestique pour vin à 10,2°GL, température moyenne d'arrivée 10°C, sur 10 jours de fabrication, mise en route, arrêts, essais compris (notamment de chambrage) : 19,58 litres par hectolitre d'alcool pur.

d) *Examen organoleptique des eaux-de-vie obtenues.*

Pour tous les essais, les produits obtenus ont été soumis à un examen organoleptique comparativement à ceux obtenus à partir des mêmes vins dans une colonne traditionnelle.

Les résultats furent nettement favorables aux échantillons provenant de la colonne spéciale.

D'autre part, un essai de distillation en alambic discontinu à repasses a donné une eau-de-vie dont l'analyse était proche de celle d'un échantillon provenant de la colonne en cours d'expérience, à partir du même vin, avec tirage de têtes, chambrage et tirage de moyens goûts. Cependant, à la dégustation, cet échantillon produit en discontinu a été jugé légèrement meilleur que celui obtenu en colonne continue spéciale.

e) *Essais prévus.*

La colonne expérimentale décrite ci-dessus sera prochainement utilisée pour produire, dans une nouvelle implantation, des eaux-de-vie fines à partir de vins très différents de ceux ayant servi aux premiers essais.

## CONCLUSION

Il est possible d'améliorer nettement la qualité des eaux-de-vie produites en colonne en concevant l'atelier de distillation de manière à reproduire les phénomènes qui se déroulent dans le procédé à repasses en alambic discontinu.

Les résultats des premiers essais sont très encourageants. Ils montrent qu'avec une dépense calorifique très inférieure à celle des alambics, on peut obtenir des eaux-de-vie dont les qualités analytiques et organoleptiques sont nettement meilleures que celles des produits obtenus en colonne classique.

Sans atteindre tout à fait la qualité des produits élaborés en discontinu, on peut s'en rapprocher très sensiblement.

Cette distillation en continu permet de produire des quantités importantes présentant des caractéristiques constantes dès lors que le régime permanent est réalisé et maintenu.

On peut assez facilement modeler la composition du distillat en fonction d'un objectif fixé, aspect qui nous paraît très intéressant dans le cas du rhum (MEJANE, 1972).

Enfin, une colonne déjà existante peut très bien être assortie des dispositifs décrits ici, mais dans beaucoup de cas, un remaniement assez important de l'installation doit être envisagé.


## SUMMARY

### PRODUCE QUALITY BRANDIES IN A CONTINUOUS PROCESS

The authors recall the advantages and disadvantages of distilling brandies in discontinuous still and in continuous column. They try to find devices which would combine the advantages of both techniques in a single device.

The general conception of the assembling, the arrangement of accessories, may allow to fix up a column ensuring some of the conditions necessary to reach the quality of the products obtained in a redistillation still.

A full-sized experimental unit has already been achieved and the results obtained are promising. The quality of the brandy produced is considerably improved without a heat comsumption superior to that of a traditional column. It is even possible to reach a quality comparable to that of the products obtained in discontinuous stills, for which investment and working costs are much higher.

The devices described here can be used for the production of agricultural and industrial rum as well as for the production of traditional or light-bodied rum thanks to the very easy adjustment of the system.



## RESUMEN

### PRODUCCIÓN DE AGUARDIENTES DE CALIDAD EN CONTINUO

Los autores recuerdan las ventajas e inconvenientes de la destilación de los aguardientes en alambique discontinuo y en columna continua. Se investigan cuáles son los dispositivos que pueden reunir las ventajas de ambas técnicas en un mismo aparato.

El concepto general del montaje y la disposición de órganos anexos, pueden permitir la construcción de una columna en la cual se obtengan las condiciones que hacen la calidad de los productos obtenidos en alambique de pasadas múltiples.

Ya se ha construido un taller experimental a escala real, y los resultados obtenidos son sumamente prometedores. Así, sin gastos caloríficos superiores a los de una columna convencional, se mejora muy sensiblemente la calidad del aguardiente producido. Incluso, existe la posibilidad de hacer que tal calidad sea comparable a la de los productos obtenidos en alambiques discontinuos, cuyos gastos de inversión y de funcionamiento son muy ampliamente superiores.

Los dispositivos descritos son aplicables en particular para la producción de ron agrícola o industrial, de son tradicional o de ron ligero, debido a la gran adaptabilidad de regulación del sistema preconizado.

## RIASSUNTO

### PRODUZIONE D'ACQUAVITI DI QUALITÀ IN CONTINUO

Gli autori ricordano i vantaggi e gli inconvenienti della distillazione dell'acquavite in alambicco discontinuo e in colonna continua. Essi ricercano quali dispositivi potrebbero combinare - vantaggi delle due techniche in uno stesso apparecchio.

La concezione generale del montaggio e la disposizione di organi annessi possono permettere di costruire una colonna che assicuri alcune delle condizioni che permettono di avere la qualità dei prodotti ottenuti in alambicco a ripassate.

E'stato realizzato un laboratorio sperimentale in grandezza natura e i risultati ottenuti sono pieni di promesse. La qualità dell'acquavite prodotta è stata sensibilmente migliorata senza un consumo calorifico superiore a quello di una colonna classica. E' persino possibile che questa qualità si possa comparare a quella dei prodotti ottenuti negli alambicchi discontinui le cui spese d'investimento e di esercizio sono di gran lunga superiori.

Grazie alla grande flessibilità di regolazione del sistema, i dispositivi descritti sono particolarmente adatti alla produzione del rum agricolo o industriale, del rum tradizionale o del rum leggero.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ANDRÉS, 1970. Notes sur l'évolution des installations de production de rhum. *Ind. alim. agric.*, **87**, 901-906.

KERVEGANT, 1946. *Rhums et eaux-de-vie de canne.* Édition du Golfe, Vannes.

LAFON R., LAFON J., COUILLAUD P., 1972. *Le Cognac, sa distillation.* Baillière, Paris.

MARILLER C., 1925. *Distillation et rectification des liquides industriels.* Dunod, Paris.

MEJANE J., 1963. L'acide sulfurique des alcools. *Ind. alim. agric.*, **80**, 1071-77 et 1181-87.

MEJANE J., 1972. Composition et qualité des eaux-de-vie. *Ind. alim. agric.*, **89**, 1323-1325.

MEJANE J., DEBAILLEUL M., LECERF J., 1973. Étude de la solubilité de l'oxygène dans l'alcool. *Ind. alim. agric.*, **90**, 719-727.

PÉRARD. *Traité de la distillerie de betteraves*, Depollier, Annecy.

*Ann. Technol. agric.*, 1975, **24** (3-4), 361-370.

# THE ANALYTICAL IDENTIFICATION OF RUM

R. J. MESLEY, D. B. LISLE, C. P. RICHARDS
and D. F. WARDLEWORTH

*Laboratory of the Government Chemist,
Cornwall House, Stamford Street,
London SE1 9NQ, (England)*

## SUMMARY

Analytical data have been collected on more than 600 spirits, resulting in a synoptic key from which an unknown spirit may be identified. The data comprise contents of higher alcohols, methanol and ethyl acetate, which can be obtained from a single gas chromatographic injection. Four criteria suffice to distinguish rums from virtually all other spirits, and it can be shown that these criteria are in fact related to the known method of production of rum.

In many countries, rum is subject to control by fiscal, consumer protection or state alcohol authorities, and for these purposes some definition is necessary. The usual features of such definitions are restrictions on the raw materials used and a specification of the minimum content of congeners (volatile compounds other than ethanol), while in some countries congener contents may be used to distinguish different types of rum. In the United Kingdom, rum is subject to a different rate of customs duty from other distilled spirits, but there is no legal definition of rum and no sub-division into types. The generally accepted definition is that it must be produced by fermentation and distillation from sugar cane products in a sugar cane growing area, and it is further understood that it must have the organoleptic characteristics normally associated with rum.

In the event of any dispute concerning the authenticity of rum, the authorities in Britain may possess documentary evidence of the country of origin of the product, but this rarely gives any indication of the method of manufacture. Any confirmation that can be provided by analysis may therefore be valuable. For this purpose, the analytical requirement is for a profile of all the secondary constituents present, rather than an overall total as is the case in many other countries. Other tasks of a revenue protection laboratory are to distinguish spirits which have been produced

by illicit stills, and to identify stolen spirits, particularly where the theft is of undutied goods from a bonded warehouse. In each of these cases, detailed analysis of the secondary constituents may enable a positive identification of the sample to be made.

The traditional chemical methods for determining total higher alcohols, total esters, total aldehydes, etc, are of limited value in building up characteristic profiles of spirits, and only the detailed analyses provided by gas-liquid chromatography are suitable for this purpose. Other determinations, such as volatile acidity and extract (non-volatile matter), may also be diagnostic.

Gas chromatographic examination of fractions obtained from rum by solvent extraction and chemical separation has revealed the presence of more than 200 volatile constituents (LIEBICH, KOENIG and BAYER, 1970). However, for fingerprinting purposes, a simple technique was required, based only on the major constituents which could readily be determined by direct injection. A data file has therefore been built up using results for methanol, *n*-propanol, 2-methylpropanol (*iso*-butanol), butan-2-ol, 2-methylbutanol (active amyl alcohol), 3-methylbutanol (*iso*-amyl alcohol) and ethyl acetate. Data on more than 600 spirits of all kinds have been accumulated in this file, and use of a computer enables ratios of individual compounds also to be stored.

## EXPERIMENTAL

### *Samples*

Most samples were obtained by retail purchase or were submitted to our laboratory by H. M. Customs and Excise for determination of spirit strength for duty purposes. Samples described as illicit were seized in connection with prosecutions for illicit distillation, and a few high-strength samples were obtained from warehouses prior to bottling. The descriptions of the spirits entered in the data file were taken from the bottle labels or accompanying Customs documents – only in the case of certain samples from distilleries was it possible to verify the source personally.

### *Gas chromatography*

The ethanol content of each sample was adjusted to approximately 40 p. 100 v/v ; a 5 ml aliquot was then mixed with 0.5 ml internal standard (5 g/l *n*-pentanol in 40 p. 100 v/v aqueous ethanol). Two µl portions of the mixture were injected into the gas chromatograph.

Column and conditions : 10 ft (3.05 m) × 1.8 mm i.d. stainless steel column packed with 8p. 100 polyethylene glycol 200 on celite 100-120 mesh ; flame ionisation detectors ; injector temperature 160°C, column 60°C, detector 230°C, nitrogen carrier gas flow adjusted to give retention time for *n*-pentanol of about 45 minutes.

Order of elution of peaks and typical response factors : ethyl acetate 0.19, methanol 0.89, butan-2 ol 0.35, *n*-propanol 0.36, 2-methylpropanol 0.36, 2-methylbutanol 0.67, 3-methylbutanol 0.67, *n*-pentanol 1.00. Contents of individual compounds calculated from peak heights, expressed as g/100 l based on ethanol content.

## RESULTS AND DISCUSSION

Table 1 shows the range of figures (expressed as g/100 l ethanol) obtained for each individual congener for the principal types of unsweetened and unflavoured spirits. Brandies and whiskies have each been sub-divided according to type or

TABLE I

*Ranges of congener contents* (g/100 l)

| | Nº of samples | Methanol | Ethyl acetate | *n*-propanol | Butan-2-ol | 2-methyl-propanol | 2-methyl-butanol | 3-methyl-butanol |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Brandy (Armagnac and Cognac) | 104 | 24-110 | 26-180 | 24-93 | 0-14 | 45-105 | 32-71 | 73-290 |
| Brandy (Marc and Grappa) | 18 | 60-2 900 | 54-500 | 32-88 | 0-370 | 39-110 | 30-71 | 97-240 |
| Brandy (other) | 116 | 23-510 | 0-470 | 2-79 | 0-120 | 0-160 | 1-65 | 2-240 |
| Brandy (overall) | 238 | 23-2 900 | 0-500 | 2-93 | 0-370 | 0-160 | 1-71 | 2-290 |
| Fruit brandies | 57 | 42-2 100 | 25-510 | 8-2 400 | 0-340 | 5-320 | 2-80 | 8-310 |
| Whisky (Scotch blends) | 49 | 9-30 | 20-70 | 31-65 | — | 46-92 | 12-34 | 27-85 |
| Whisky (Scotch malt) | 39 | 4-11 | 25-84 | 28-64 | 0-4 | 42-170 | 31-73 | 125-225 |
| Whisky (Bourbon) | 15 | 12-32 | 44-180 | 11-42 | — | 35-125 | 35-120 | 75-350 |
| Whisky (overall) | 138 | 2-45 | 9-180 | 1-98 | 0-4 | 7-170 | 0-120 | 0-350 |
| Vodka | 15 | 3-83 | 1-26 | 0-4 | — | 0-6 | 0-5 | 0-17 |
| Rum (congeners < 280) (1) | 47 | 0-20 | 4-120 | 5-105 | 0-10 | 0-71 | 0-26 | 0-125 |
| Rum (congeners > 280) (1) | 28 | 4-23 | 37-1 200 | 40-1 300 | 0-350 | 8-103 | 5-61 | 17-290 |
| Rum (overall) | 75 | 0-23 | 4-1 200 | 5-1 300 | 0-350 | 0-103 | 0-61 | 0-290 |
| Illicit spirits | 35 | 0-5 | 17-82 | 8-45 | 0-5 | 36-250 | 11-112 | 70-540 |

(1) Total congeners (g/100 l) for this purpose taken as higher alcohols plus ethyl acetate.

origin, while the rums have been separated into two groups containing more or less than 280 g/100 l congeners.

From these figures it can be seen that :

(1) even the lightest rums contain more *n*-propanol than any of the vodkas ;
(2) the methanol content of all the rums is lower than that of any brandy or fruit brandy ;
(3) nearly all whiskies and all vodkas are distinguished by the absence of any measurable amount of butan-2-ol.

The latter is only a negative feature, since this compound is also absent from the majority of rums and brandies. The figures in table 1 are thus insufficient on their own to distinguish with certainty rums from whiskies or from illicit spirits, and also (although it is not the concern of this symposium) brandies from fruit brandies or from whiskies. To assist in this further separation, the ratios of certain congener contents have been calculated and are shown in table 2.

The ranges for these ratios still overlap to some extent, but it can be seen that :

(1) the ratio ethyl acetate/methanol is frequently much higher for rums and illicit spirits than for other spirits ;
(2) the ratio *n*-propanol/2-methylpropanol is generally higher for rums than for whiskies and illicit spirits ; and
(3) the ratio 2-methylbutanol/3-methylbutanol is often lower for rums than for whiskies.

The ratio of the combined amyl alcohols to 2-methylpropanol was used by SINGER (1966) to distinguish brandies from whiskies, but with the greater number of results now available it is clear that this distinction is only valid for restricted classes of spirits, e.g. in distinguishing Cognacs from blended Scotch whiskies, and this ratio is of no value in identifying rums.

For the purpose of identifying any unknown sample solely by analytical data, a lengthy synoptic key has been produced, but this can be greatly simplified if the object is only to distinguish rum from other spirits. Virtually all rums were found to possess the following characteristics :

| | |
|---|---|
| Methanol content ...................... | $< 23$ g/100 l ethanol |
| Ratio *n*-propanol/2-methylpropanol ...... | $> 0.7$ |
| Ratio 2-methylbutanol/3-methylbutanol .. | $< 0.38$ |
| Ratio ethyl acetate/methanol ............ | $> 1.8$ |

Samples in which any of these constituents were not detectable were automatically excluded, and for this reason two white rums, together with two imitation rums, all the vodkas and several grain whiskies were rejected. These two white rums contained no amyl alcohols and might well be unacceptable as rums according to the definitions used in some european countries. In contrast, 10 of the 500 samples not described as rum also possessed all four of these characteristics given for rum. Three of these were illicit spirits, probably produced from sugar or treacle, three were oriental spirits of unknown origin and four were Scotch malt whiskies. The latter have quite pronounced flavours and are unlikely in practice to be confused with rums. This combination of four criteria is thus capable of separating rums from all other spirits with a success rate of about 98 p. 100.

TABLE 2

*Ratios of congener contents*

| | Nº of samples | ethyl acetate / methanol | 2-methylbutanol / 3-methylbutanol | *n*-propanol / 2-methylpropanol | 2 + 3-methylbutanol / 2-methylpropanol |
|---|---|---|---|---|---|
| Brandy (Armagnac and Cognac) | 104 | 0.2-3.1 | 0.20-0.55 | 0.34-1.07 | 1.2-4.5 |
| Brandy (Marc and Grappa) | 18 | 0.07-1.7 | 0.23-0.35 | 0.44-1.32 | 2.3-4.3 |
| Brandy (other) | 116 | 0-2.8 | 0.03-2.0 | 0.05-4.0 | 0.2-6.5 |
| Brandy (overall) | 238 | 0-3.1 | 0.03-2.0 | 0.05-4.0 | 0.2-6.5 |
| Fruit brandies | 57 | 0.04-4.2 | 0.14-0.40 | 0.32-77 | 0.7-5.9 |
| Whisky (Scotch blends) | 49 | 1.0-6.5 | 0.34-0.46 | 0.46-1.2 | 0.5-1.5 |
| Whisky (Scotch malt) | 42 | 3.1-15 | 0.29-0.56 | 0.23-1.0 | 1.3-2.9 |
| Whisky (Bourbon) | 15 | 2.4-7.4 | 0.27-0.57 | 0.12-0.52 | 2.9-4.6 |
| Whisky (overall) | 138 | 0.4-17 | 0.27-0.57 | 0.12-2.2 | 0.5-4.6 |
| Vodka | 15 | 0.07-3.1 | — | — | — |
| Rum (congeners < 280) (1) | 47 | 0.5-31 | 0.15-0.45 | 0.7-6.7 | 0-5.8 |
| Rum (congeners > 280) (1) | 28 | 2.6-167 | 0.14-0.33 | 0.9-42 | 1.9-7.2 |
| Rum (overall) | 75 | 0.5-167 | 0.14-0.45 | 0.7-42 | 0-7.2 |
| Illicit spirits | 35 | 7-194 | 0.15-0.41 | 0.08-0.9 | 0.9-6.5 |

(1) See footnote in table 1.

Since some of the figures used are critical, it should be pointed out that they may be to some extent dependent on the column conditions used. The system chosen was intended primarily to give the best separation of the higher alcohols, and it is not necessarily the ideal column for methanol or ethyl acetate. It is possible that slightly lower methanol results may be obtained with other column materials, while the ethyl acetate peak is known to be subject to interference from any diethylacetal present. This does not prevent the result from being used in an empirical classification scheme, and any disadvantage is outweighed by the convenience of obtaining all the results from a single injection. The effect of the column on the ratio of the two amyl alcohols will be considered later.

Before considering the significance of these four criteria, it is instructive to see which of them exclude which other classes of spirits. In the first place, all vodkas and some grain whiskies are eliminated by the absence of amyl alcohols. The limit on methanol excludes all brandies and fruit brandies, and indeed virtually all other spirits except whiskies and the illicit spirits. The ratio of *n*-propanol to 2-methylpropanol eliminates most of the illicit spirits, all the U. S., Canadian, Japanese, Dutch and Irish whiskies and about two-thirds of the Scotch whiskies. The remainder are then excluded by the ratio of the amyl alcohols. The fourth criterion, the ratio of ethyl acetate to methanol, is thus not essential but is included as an additional filter to ensure the elimination of Scotch grain whiskies. The latter are used mainly for blending and only one brand is known to be commercially available in bottle, so relatively few samples were included in this survey. Many of these contained no amyl alcohols, but where these alcohols are present it is possible that the ratio could fall below 0.38, leading to their inclusion with the rums unless the ethyl acetate/methanol ratio is also considered.

The separation scheme so far described was developed quite empirically from the results of examining nearly 600 spirit samples. However, its value in distinguishing different spirits would be enhanced if it could be demonstrated that the criteria used were attributable to the materials used or the method of production of the various spirits. The congeners in a distilled spirit may depend upon the raw materials used, the conditions of fermentation and the distillation technique, and all three of these factors are important in the case of rum.

The first and most significant characteristic of rums is the very low content of methanol. This is shared with vodkas (and also gins), the illicit spirits, which in Britain are mostly obtained from fermented sugar or treacle solutions, and the Scotch whiskies. On the other hand, very high methanol contents are found in the fruit brandies and the marc and brandies other than Cognac and Armagnac. REINHARD (1969), commenting on the derivation of methanol in brandy from breakdown of pectin, has correlated the higher values in marc brandies with the presence of pectolytic enzymes in grape skins, and a similar explanation is probably valid for the fruit brandies. Conversely, the low methanol content of other spirits may be ascribed to the absence of pectin in grain and sugar products.

The methanol content of a spirit is not significantly affected by rectification, but in the case of the higher alcohols the overall content and the proportions of individual alcohols are very much dependent on the technique of distillation. An exception to this statement is butan-2-ol, which occurs in appreciable amounts in some rums and brandies but is virtually absent in many others. REINHARD (1969)

observed a correlation with the methanol content in brandies and fruit brandies, and this is confirmed in general terms by the present work : butan-2-ol was found in nearly all fruit brandies, marc brandies and, to a smaller extent, the lesser French brandies, but was not measurable in Armagnacs, Cognacs and brandies from Spain, Cyprus, Greece and Australia. These results, together with the absence of this alcohol from grain spirits, suggest a derivation from some ingredients of fruit skins, but this explanation is clearly not applicable to rums. Some 20 p. 100 of the rum samples, particularly those from Jamaica, contained butan-2-ol, but none of these had exceptional methanol contents. A possible explanation is provided by HIEKE (1972), who ascribed a high butan-2-ol content in wines to spoilage by bacterial or mould fermentation, and it is significant that those Jamaica rums which contain more than 100 g/100 l p.A. of butan-2-ol also contain exceptional amounts of *n*-propanol.

Turning to the primary alcohols, the quantity and proportions of fusel alcohols in fermented liquors are known to be affected by the strain of yeast used (ENGAN, 1974), while in distilled spirits the distillation technique is also a major influence. These alcohols may be formed in various ways, but a major contribution is generally attributed to the Ehrlich pathway from α-amino acids :

$$\underset{\displaystyle NH_2}{R.\overset{}{CH}.COOH} \longrightarrow R.CO.COOH \longrightarrow R.CHO \longrightarrow R.CH_2OH$$

Thus a proportion of the 2-methylpropanol and 2- and 3-methylbutanols is formed from valine, leucine and isoleucine. Formation of *n*-propanol by the Ehrlich pathway is less certain, since the amino-acid precursor would be α-aminobutyric acid, which is not normally present in yeast fermentation systems. GUYMON, INGRAHAM and CROWELL (1961) have attributed the formation of *n*-propanol in the fermentation of glucose to an Ehrlich-type pathway starting from α-ketobutyric acid, an intermediate in the synthesis of isoleucine, which itself gives rise to 2-methylbutanol. The values for the ratio *n*-propanol/2-methylpropanol show that rums in general contain proportionately more propanol than all other spirits except some fruit brandies. If this additional propanol were derived from α-ketobutyric acid, one might expect it to be associated with an increased 2-methylbutanol content, but in fact the ratio of 2- to 3-methylbutanol in rums is comparable to that for Cognacs and distinctly lower than the value for whiskies, so some other explanation is necessary.

Exceptionally high figures for the *n*-propanol/2-methylpropanol ratio (*i.e.* 10 or more compared with typical values of 2 for other rums and about 0.5 for most brandies and whiskies) are found in some heavy Jamaica rums, most of which also contain high levels of butan-2-ol and ethyl acetate. It is probably safe to attribute these to bacterial fermentation, but this cannot be true for the majority of rums. Coupled with the low methanol content, the high propanol figure is one of the most characteristic analytical features of rum from all parts of the world, and must therefore be associated with its starting materials. It is significant that the illicit spirits produced in Britain from refined sugar or refinery syrups do not show this feature, so it seems reasonable to attribute it to a constituent of cane juice or molasses which is removed during the manufacture of sugar. One of the major amino acids in molasses is the dicarboxylic acid glutamic acid, either in the free state or as its amide gluta-

mide. BÖTTGER and STEINMETZER (1960) have shown that in beet molasses some of the glutamic acid is decarboxylated by means of an enzyme to give γ-aminobutyric acid, which is also a known constituent of cane molasses. There is also evidence (RODRIGUEZ, 1968) for the presence of α-aminobutyric acid in cane molasses and this has been shown to be formed from glutamic acid in sunlight, particularly in the presence of sucrose (PERTI, BAHADUR and PATHAK, 1961). A possible mechanism for the formation of *n*-propanol in rum fermentation would thus be the Ehrlich pathway from α-aminobutyric acid and ultimately from glutamic acid. Some support for this comes from the observation by MAUREL, SANSOULET and GIFFARD (1965) that *n*-propanol is more predominant in rums made from molasses than in those from cane juice.

The other higher alcohol ratio used in the classification scheme is that of the two amyl alcohols, 2- and 3-methylbutanol. This measurement depends on the use of a GLC system which gives complete resolution of these peaks and data in the literature is therefore limited. DRAWERT, HEIMANN and TSANTALIS (1967) comment on different relative proportions of these alcohols between Cognacs and German brandies, and much greater differences are apparent in this work, but the actual results all show higher ratios of 2-methylbutanol/3-methylbutanol than those of the German workers. Correlation with the results of MARTIN and CARESS (1971) is also difficult and the differences are presumably due to varying degrees of resolution on the different column systems used. By the technique used on this work, nearly all rums and brandies give a ratio below 0.35 while most whiskies are above this figure. The only other spirits giving a consistently high ratio are Dutch genevas, so this appears to be a characteristic of grain spirits. The final ratio characteristic of rum is that of ethyl acetate to methanol. Ethyl acetate is present in all potable spirits and is one of the predominant aroma constituents. The ethyl acetate content increases during maturation of the spirit at a rate dependent on the amount of acetic acid present (SCHOENEMAN, DYER and EARL, 1971). The relatively high ratio (generally between 3 and 20) in most rums is in fact due more to the low methanol content than to a high value for ethyl acetate, but in certain Jamaica rums the ester content is much greater, so that the ratio may increase to over 100. The conditions of fermentation of these rums permit the development of acetic acid and thus of ethyl acetate, and the pot still distillation technique does little to remove these constituents. The illicit spirits also tend to have a high ethyl acetate/methanol ratio, which again is probably due to the acidity of the wash.

## CONCLUSIONS

The scheme we have outlined has shown itself capable of distinguishing rums as a class from all other spirituous beverages available in Britain. The constituents on which the scheme is based are not peculiar to rum and are consequently not those mainly responsible for the characteristic flavour and aroma associated with rum. Nevertheless, the relative proportions of these constituents can be related to the raw material or the method of production of rum and their use as diagnostic

features can thus be justified. Detailed comparison with individual results may allow an unknown sample to be identified as a particular type of rum and even, in favourable circumstances, as a particular commercial brand.


## RÉSUMÉ

### IDENTIFICATION ANALYTIQUE DU RHUM

Des résultats analytiques ont été réunis sur plus de 600 eaux-de-vie, donnant une clé synoptique à partir de laquelle une eau-de-vie inconnue peut être identifiée.

Les résultats comprennent les taux d'alcools supérieurs, de méthanol et d'acétate d'éthyle, qui peuvent être obtenus à partir d'une seule injection en chromatographie en phase gazeuse.

Quatre critères suffisent pour distinguer les rhums des autres alcools ; ces critères sont en fait liés à la méthode connue de production du rhum.



## RESUMEN

### IDENTIFICATION ANALITICA DEL RON

Han sido reunidos los resultados analíticos respecto a más de 600 aguardientes, que constituyen una llave sinóptica a partir de la cual puede ser identificado un aguardiente.

Los resultados integrán los contenidos de alcoholes superiores, de metanol y de acetato de etilo, que pueden ser obtenidos a partir de una inyección única en cromatografía de fase gaseosa.

Cuatro criterios bastan para distinguir los rones de los demás alcoholes. Estos criterios se encuentran vinculados, en realidad, al método conocido de producción de ron.



## RIASSUNTO

### IDENTIFICAZIONE ANALITICA DEL RUM

Più di 600 acquaviti sono state sottoposte ad analisi. I risultati hanno permesso di stabilire una tabella sinottica che permette di identificare un'acquavite sconosciuta.

In questi risultati sono inclusi i tassi d'alcooli superiori, di metanolo e di acetato d'etile che passono essere ottenuti a partire da una sola iniezione in gas-cromatografia.

Quattro criteri bastano per distinguere i rums dagli altri alcooli ; questi criteri sono infatti legati al noto metodo di produzione del rum.


## REFERENCES


Boöttger S., Steinmetzer W., 1960. *Z. Zuckerind.*, **10**, 281.

Drawert F., Heimann W., Tsantalis G., 1967. *Z. analyt. Chem.*, **228**, 170.

Engan S., 1974. *Brew. Dig.*, **48**, 52.

Guymon J. F., Ingraham J. L., Crowell E. A., 1961. *Arch. Biochem. Biophys.*, **95**, 163.

Hieke E., 1972. *Allg. Deutsche Weinfachzeitung*, **108**, 24.

Liebich H. M., Koenig W. A., Bayer E., 1970. *J. Chromat. Sci.*, **8**, 527.

Martin G. E., Caress E. A., 1971. *J. Sci. Food. Agric.*, **22**, 587.

MAUREL A., SANSSOULET O., GIFFARD Y., 1965. *Ann. Fals. Exp. Chim.*, **58**, 291.

PERTI O. N., BAHADUR K., PATHAK H. D., 1961. *Proc. Natl. Acad. Sci., India*, **30** A, 206 (through *Chem. Abs.*, 1962, **56**, 15 792 *d*).

REINHARD C., 1969. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*, **65**, 223.

RODRIGUEZ M., 1968. *Sobre Deriv. Cana Azucar*, **2**, 17.

SCHOENEMAN R. L., DYER R. H., EARL E. M., 1971. *J. Assoc. Offic. Analyt. Chem.*, **54**, 1247.

SINGER D. D., 1966. *Analyst*, **91**, 127.

*Ann. Technol. agric.*, 1975, **24** (3-4), 371-381.

# FORMATION OF ACETALS IN RUM : A KINETIC STUDY

K. MISSELHORN

*Institut für Gärungsgewerbe,*
*1 Berlin 65, Seestrasse 13, (Germany)*

## SUMMARY

From time to time in literature, references on the importance of acetals as aroma compounds in rum and other alcoholic beverages are to be found. Most of these references are of qualitative nature, rarely concentrations are mentioned. For that reason, we developed a specific and sensitive photometrical method of determination and compared it with gas chromatographic data.

As the formation of acetals is an equilibrium reaction, one should think to find the aldehyde acetal contents in a distinctive relation to the percentage of alcohol in rum. In contrast to this hypothesis, again and again we found deviations from calculated data.

Therefore, we were forced to gain some more information about the kinetics of that reaction. It could be shown that the velocity of the formation of acetals depends mainly on the formation of semi-acetals which turn into acetals with high speed.

Using the known equilibrium constants of several acetals, we calculated their contents in rum and determined their sensoric threshold. Due to these results, we are inclined to point out that many of the acetals are without any importance for the aroma of rum and a great deal of them reported in literature are artificial products.

Any one dealing with the aroma of spirits, will often find the information in the pertinent, even old literature, that the group of acetals is of prominent importance for the flavour. Apart from other components, more than fifty different acetals have been identified among the aroma components of rum. The acetals can be well identified by gas chromatography. But they are very unstable and special precautionary steps must be taken if at least partial destruction during the GC separation shall be avoided. For this reason, chemical methods appear more suitable for quantitative determination.

A method utilizing the reaction of aldehydes with bisulfite has been published by GUYMON and CROWELL (1963). Such titration methods reach a sensitivity of approximatively 10-20 p.p.m. and unfortunately are too unspecific, because they cover all aldehydes. Therefore we developed a photometric method of determination,

based on the reaction of sodium nitroprusside and piperidine in alkaline environment. We investigated rums and other spirits by means of this method. This resulted in acetal contents, which we primarily found to be unexplainable. This shall be explained by the table 1.

TABLE I

*Content of acetal in rum*

| | Alcohol Vol (%) | pH | Aldehyde (mg/l) | | Combined (%) |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | Total | Alcohol combined | |
| Martinique rum 3 years old ........ | 45 | 4.4 | 72 | 12 | 17 |
| West-Indies rum unaged .......... | 45 | 6.2 | 89 | 34 | 36 |
| Jamaica rum about 2 years old .... | 75 | 4.2 | 275 | 129 | 47 |
| Jamaica rum, blended unaged ...... | 45 | 5.3 | 27 | 9 | 32 |

According to the law of mass action, the proportion of combined aldehyde should be in a fixed relation with respect to the alcohol content. From the ascertained values, I selected 3 rums of 45 p. 100 of alcohol. The acetal contents range between 17 and 36 p. 100. Only the Jamaican rum of 75 p. 100 has a higher acetal content, viz. 47 p. 100. The blend produced therefrom, however, has 32 p. 100 of acetal only.

The pH too is not suitable for clarifying the conditions. The Martinique rum and the Jamaican rum have similar pHs, while the acetal proportions are completely different (17 or 47 p. 100). The West Indies rum has the highest pH, while the p. 100 ranges in the medium field.

This brief discussion should explain why we thought it to be advisable to deal with the equilibrium situation of acetalization and with the kinetics of reaction.

Peynaud and Maurié (1938) published equilibrium data of acetal and aldehyde as a function of the alcohol contents already in 1938. They are in good agreement with our results.

The abscissa of the figure 1 shows the alcohol contents in p. 100 by volume while the ordinate shows the proportion of combined aldehyde from the total aldehyde content in p. 100. The circles indicate the acetal proportions determined. Calculation of the equilibrium constant for a medium alcohol content of 50 p. 100 results in a value of 0.111. These calculated values take the path indicated by the full-line curve in the figure.

The test values are below the law of mass action for high alcohol contents and are higher for lower contents. The assumption that the adjustment of equilibrium has not been entirely achieved in the experiments could be rejected by our own tests. We observed that a relatively good conformity with the law of mass action occurred when the square was omitted with the alcohol concentration. This however would mean that exclusively semi-acetal would be formed. This would be a complete

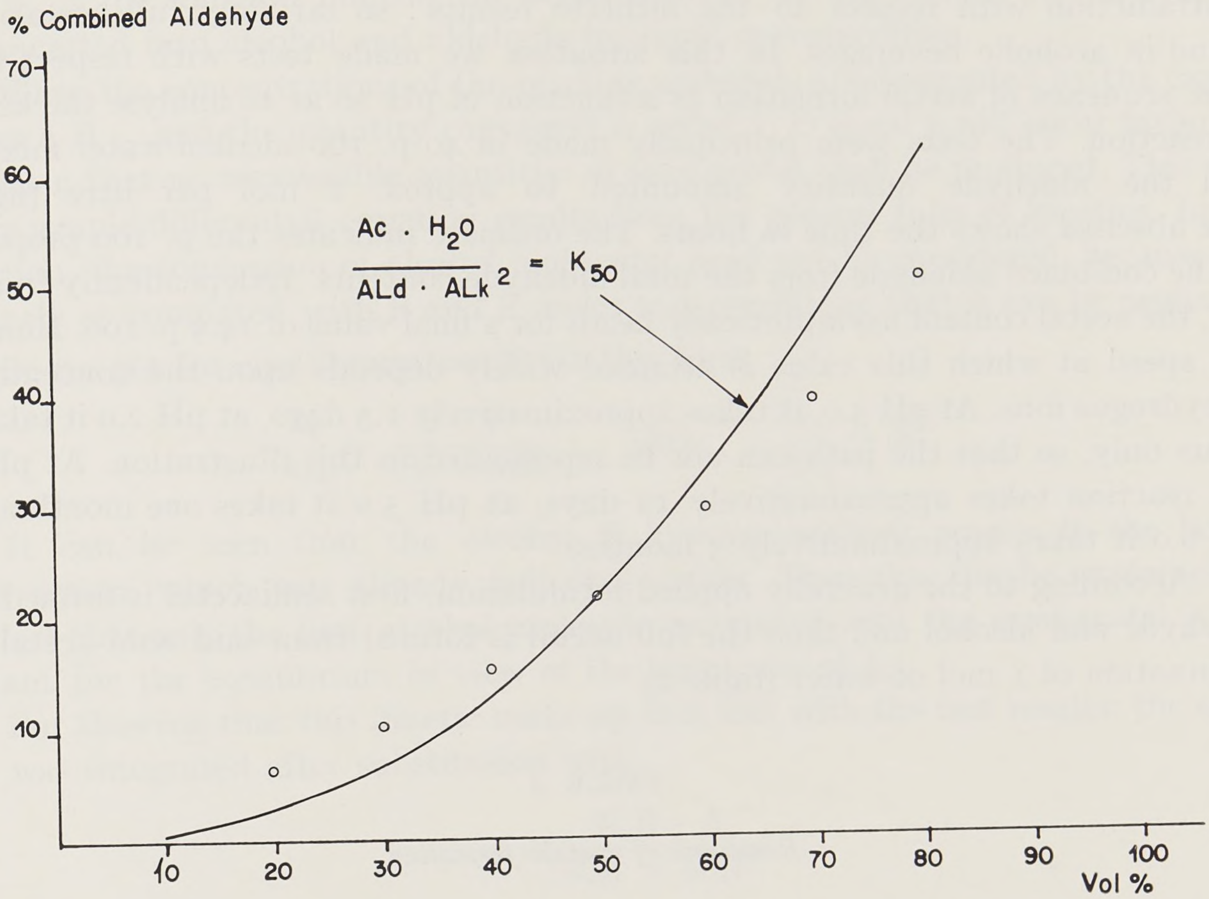



FIG. 1. — *Proportion of combined aldehyde at different concentration of alcohol*

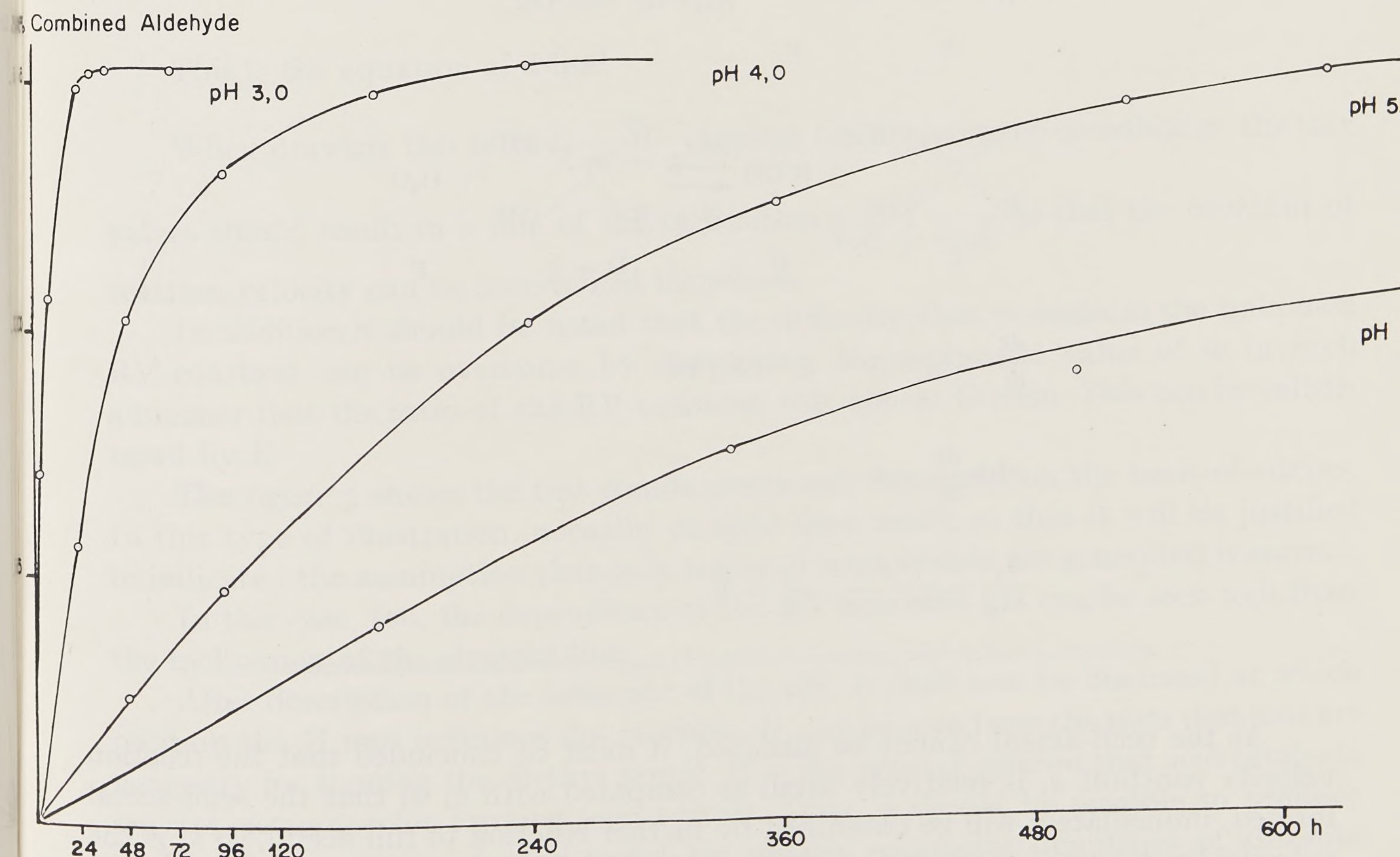


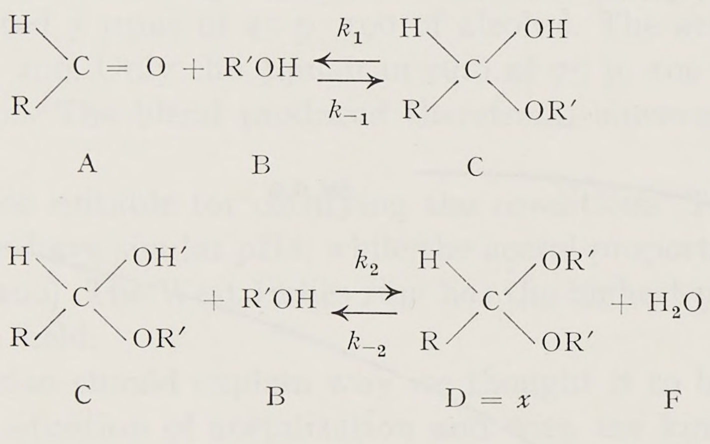

FIG. 2. — *Kinetics of acetal formation in 40 p. 100 alcohol*

contradiction with respect to the hitherto results : so far only full acetals were found in acoholic beverages. In this situation we made tests with respect to the time sequence of acetal formation as a function of pH so as to analyse the kinetics of reaction. The tests were principally made in 40 p. 100 alcohol-water mixtures, and the aldehyde quantity amounted to approx. 1 mol per litre (fig. 2). The abscissa shows the time in hours. The ordinate indicates the p. 100 proportion of the combined aldehyde from the total aldehyde contents. Independently from the pH, the acetal content asymptotically heads for a final value of 14.9 p. 100. However, the speed at which this value is attained widely depends upon the concentration of hydrogen ions. At pH 3.0, it takes approximatively 1.5 days, at pH 2.0 it takes 2.5 hours only, so that the path can not be represented in this illustration. At pH 4.0, the reaction takes approximatively 12 days, at pH 5.0 it takes one month and at pH 6.0 it takes approximatively 3 months.

According to the generally applied formulation, first semiacetal is formed from aldehyde and alcohol and then the full acetal is formed from said semi-acetal with elimination of 1 mol of water (table 2).

TABLE 2

*Reactions of acetals formation*



$$\frac{dx}{dt} = k_1 \text{ B}(\text{A} - x) - k_{-2} \text{ F}x$$

$$\text{with } \frac{dx}{dt} = 0$$

$$\frac{k_1}{k_{-2}} = \frac{x \cdot \text{F}}{(\text{A} - x) \cdot \text{B}} = \text{K}$$

As the semi-acetal cannot be analysed, it must be concluded that the reaction velocity constant $k_1$ is relatively small as compared with $k_2$ so that the semi-acetal formed, immediately will be consumed by further reaction to full acetal, so $k_1$ is the velocity limiting constant for formation of the full acetal. On the other hand, in the hydrolysis of the full acetal there must be $k_{-2}$ much smaller than $k_{-1}$ so that in this

case $k_{-2}$ is the constant limiting the decomposition and the formed semi-acetal will be converted into alcohol and aldehyde by rapid decomposition.

When the concentrations of the reacting materials are designated by the capital letters A B ... and the quantity converted is called $x$, D equal $x$ will occur under the condition that no measurable quantities of semi-acetal shall be produced. This relatively simple differential equation results from the general rules of kinetics. In the equation, the conversion of alcohol and water need not be considered, because $x$ is so small as compared with B and F under test conditions that it can be neglected.

So we get for equilibrium condition this term :

$$\frac{k_1}{k_{-2}} = \frac{x \cdot \mathrm{F}}{(\mathrm{A} - x)\mathrm{B}} \qquad \text{with} \qquad \frac{k_1}{k_{-2}} = \mathrm{K}.$$

It can be seen that the alcohol B appears without square in the law of mass action, which was already indicated earlier. Thus this can be explained by the fact that only the first alcohol molecule converted into the semi-acetal is important for the equilibrium in view of the small size of $k_1$.

For showing that this kinetic make-up is in line with the test results, the equation was integrated after substitution with :

$$m = \frac{\mathrm{K_1B} \cdot \mathrm{A}}{k_1\mathrm{B} + k_{-2}\mathrm{F}}.$$

After separation of the variable, the formula is obtained :

$$t = \frac{1}{k_1\mathrm{B} + k_{-2}\mathrm{F}} \qquad l_n \frac{m}{m - x}.$$

This is the equation of a line.

When drawing this term $l_n \frac{m}{m - x}$ against $t$ in a system of coordinates, the test values should result in a line of the inclination $\frac{1}{k_1\mathrm{B} + k_{-2}\mathrm{F}}$ so that the constant of reaction velocity can be ascertained therefrom.

In addition it should be noted that the difficulty that $m$ contains the unknown RV constant can be overcome by developing the reciprocal value of $m$ in such a manner that the ratio of the RV constant will appear therein. This can be substituted by K.

The figure 3 shows the test results previously discussed on the basis of curves. In this type of illustration, actually straight lines result so that it will be justified to indicate : the assumption that only traces of semi-acetals are generated is correct.

In this case, too, the dependence of the RV upon the pH can be seen well from the inclination of the straight line.

After description of the influence of the pH, it shall now be discussed at which position the H ions influence the reaction. It can be seen from the tests that ions are necessary for forming the diethyl acetal. It is the general opinion that acid catalysts are not necessary for forming semi-acetals. Thus, it should be possible to produce analysable quantities of semi-acetal by mixing equimolar quantities of absolute alcohol and aldehyde because this will exclude the further reaction to full acetals.

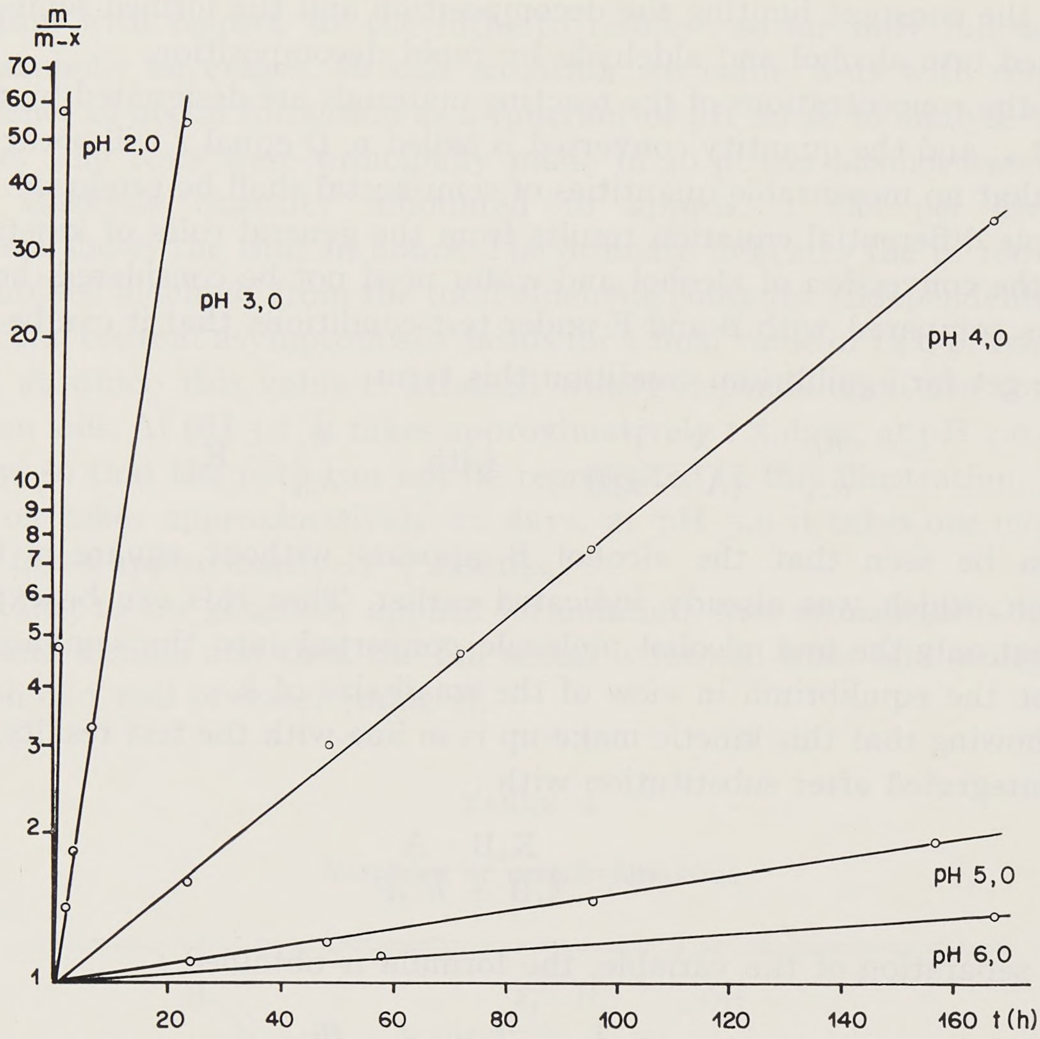



FIG. 3. — *Adjustement of the data to the theory of acetals formation*

The first chromatogramm shows the mixture of aldehyde and alcohol containing a trace of water which is not converted even after 24 hours. Beside this is indicated the 20 mn gas-chromatogram after one drop of $n/10$ hydrochloric acid was added, to 50 ml of mixture. Diethyl acetal and a new peak were generated, which has never been shown, as far as I know. Only the semi-acetal can be concerned and we made an identification by mass-spectrometry. The semi- and full-acetal peak increased after three hours from addition of acid. Fourteen hours later, the semi-acetal only is a relatively small peak and one day later it disappears completely. It can be concluded from this attitude that H ions are necessary already for forming semi-acetal. As it is also known that those aldehydes, showing a tendency towards hydrate formation, can be acetalized easily, we think that the reaction scheme of table 3 is obvious.

Hydrate protonized complex explains why semi-acetal cannot be found in spirits.

Reactions in conjunction with ionisation generally can be assumed to be rapid so that the velocity will be limited by the mentioned constants $k_1$ and $k_{-2}$.

Now let us revert to the samples of table 1 containing un explainable acetal contents.

The first four columns of table 4 indicate previous shown contents without any modification. The fifth column shows the values calculated in line with the law of mass action (without the square with the alcohol).

TABLE 3

*Reactions of acetals formation involving hydrate protonised aldehyde*

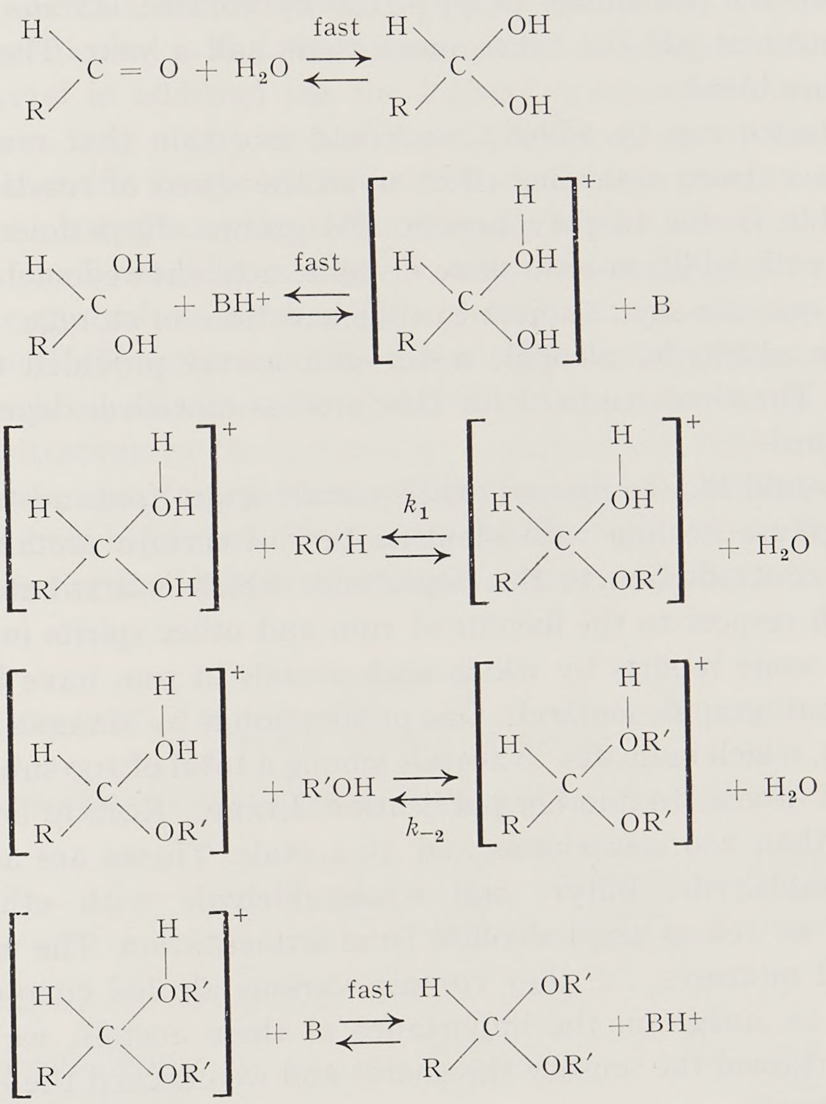


TABLE 4

*Calculated content of acetals in rum*

| | Aldehyde mg/l alcohol | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | Vol (%) | pH | Total | Combined found | Calculated |
| Martinique rum 3 years old ........ | 45 | 4.4 | 72 | 12 | 13 |
| West-Indies rum unlodged ........ | 45 | 6.2 | 89 | 34 | 16 |
| Jamaica rum about 2 years old ..... | 75 | 4.2 | 275 | 129 | 123 |
| Jamaica rum, blended unlodged ..... | 45 | 5.3 | 27 | 9 | 5 |

First of all, let us consider the two stored rums, *i.e.* the Martinique and Jamaican rum. The balance was adjusted relatively exactly. On the other hand, the two non-stored rums show approximativily twice the quantity of acetal as compared with the calculation.This can be explained by the fact that the Martinique rum imported to Germany had a high alcohol percentage and had no longer been stored after reduction of the percentage to 45 p. 100 by volume. As has been shown, the balance adjustment at pH 6.2 takes more than half a year. The same applies to the Jamaican rum blend.

A further factor can be added : we could ascertain that materials extracted from wood have a strong retarding effect upon the speed of reaction. The effective principle probably is due to polyphenolic OH groups. Experiments with alcohol-water mixtures with addition of tannine or gallic acid showed such retarding effect.

Principally one can say : subject to sufficient time of storage, there will be the balance between aldehyde, alcohol, water and acetal provided that the pH will not exceed 7-8. The time required for this process moreover depends on the other materials contained.

Finally, I would like to discuss other acetals apart from acetaldehyde-diethyl acetal. The literature dealing with identification of certain acetals ist very small. This is in some contradiction to the importance which is attributed to this group of materials with respect to the flavour of rum and other spirits in general. In any event, there are some reports by which such acetals in rum have been determined by the gas-chromatographic methods. One publication is by MAARSE and ten NOEVER de BRAUW (1966), which indicates 16 acetals among a total of 100 substances partially identified in rum aroma. In another publication, LIEBIG, KOENIG and BAYER (1970) identified more than 200 compounds and 45 acetals. Theses are acetals of acetaldehyde, propionaldehyde, butyr- and *i*-valeraldehyde with ethanol, propanol, *i*- and *n*-butanol as well as amyl alcohols from fermentation. The major proportion is in the form of mixtures, *i.e.* they contain various alcohol components.

To provide an image on the importance of these acetals, we produced some of them, we ascertained the sensory thresholds and we checked the literature to find equilibrium constants.

In the table 5 we have listed some acetals, about which, on the one hand,

TABLE 5

*Equilibrium constant of acetals*

| | K | Aldehyde (mg/l) | |
|---|---|---|---|
| | | Total | Combined |
| 1.1-diäthoxy-äthan | 0.9 | 100 | 15 |
| 1.1-diäthoxy-propan | 1.0 | 0.8 | 0.16 |
| 1.1-diäthoxy-*i*-butan | 0.57 | 12 | 1.3 |
| 1.1-diäthoxy-*i*-pentan | 0.63 | 10 | 1.2 |
| 1.1-diisopentoxy-äthan | 10.9 | 100 | 0.35 |

equilibrium constants were found and about the aldehydes of which quantitative information was found in the literature. The highest quantities known to us are indicated in column 2. In column 3, you find the calculated acetal quantities occuring in equilibrium condition. Contents range between 0.16 and 1.3 mg/litre for the ethanol-containing acetals-apart from acetaldehydediethylacetal. As an example for « non-ethanol » acetals, acetaldehyde di-isoamyl acetal was chosen because, apart from ethanol, amyl-alcohol is the alcohol compound of which the largest quantities occur and this acetal in addition has the highest equilibrium constant ever determined. Nevertheless, only 0.35 p. 100 of the aldehyde are in the form of acetal. The reason for this is that the amyl alcohol in spirits is facing a water content higher by a factor of 1 000, which displaces the balance nearly total towards the free aldehyde.

In addition, let us consider in table 6 some sensory threshold values of acetals and let us assume the values determined in water for comparison purposes, and we shall see that practically only acetaldehyd di-ethyl acetal attains a concentration ranging above the threshold value. The higher acetals have thresholds which are above the possible concentrations by the factor of 30 — particularly with respect to the acetaldehyd di-isoamyl acetal. Only for exemplification purposes, additionally 3 thresholds in 40 p. 100 alcohol are indicated. They are higher by 10-80 times! So we come to the conclusion that most of the hitherto identified acetals are without importance for the flavour of rum.

TABLE 6

*Sensory threshold of acetals*

| | Acetal in water (mg/l) | Acetal in alcohol (mg/l) 40 Vol (%) | Aldehyde in water (mg/l) |
|---|---|---|---|
| 1.1-diäthoxy-äthan | 0.1 | 8 | 0.2 |
| 1.1-diäthoxy-propan | 0.4 | | 0.2 |
| 1.1-diäthoxy-butan | 1 | | 0.05 |
| 1.1-diäthoxy-isobutan | 2 | 80 | 0.1 |
| 1.1-diäthoxy-pentan | 2 | | 0.2 |
| 1.1-diäthoxy-isopentan | 3 | | 0.2 |
| 1.1-diäthoxy-hexan | 4 | | 0.05 |
| 1.1-diisopentoxy-äthan | 8 | 80 | 0.2 |

However, when the concentrations of higher acetals are so small — how could the authors determine and identifythe substances by gas chromatography? Considering the working methods, these publications again and again indicate that extracts were produced before the gas-chromatographic separation. Such extracts, however, have to be dried prior to distillation of the solvent. This means that the hydrolytic influence of water on the equilibrium is eliminated in the extract. Furthermore, the relation between higher alcohols and aldehydes is widely displaced and as such extracts mostly react strongly acid, the reaction velocity of acetalization is considerable. Therefore, I am very sceptical with respect to those analyses and I think that these acetals are artefacts to a wide extent.

## RÉSUMÉ


### FORMATION D'ACÉTALS DANS LE RHUM : ÉTUDE CINÉTIQUE

On trouve de temps en temps dans la littérature des références relatives à l'importance des acétals en tant que composés aromatiques du rhum et d'autres boissons alcoolisées. La plupart de ces références concernent des études qualitatives, les concentrations sont rarement mentionnées. C'est pourquoi nous avons mis au point une méthode de détermination par photométrie spécifique et sensible et comparé les résultats obtenus avec ceux livrés par la chromatographie en phase gazeuse.

Comme la formation d'acétals est une réaction d'équilibre, on pourrait croire que la teneur en acétaldéhyde présente une relation particulière avec le pourcentage d'alcool dans le rhum. Contrairement à cette hypothèse nous avons toujours trouvé des déviations par rapport aux données calculées.

Nous avons donc été amenés à nous renseigner un peu plus sur la cinétique de cette réaction. Il a été démontré que la vitesse de formation des acétals est essentiellement fonction de la formation des semi-acétals qui se transforment très vite en acétals.

En se fondant sur la connaissance des constantes d'équilibre de plusieurs acétals, nous avons calculé leurs teneurs dans le rhum et déterminé leur seuil gustatif. En fonction de ces résultats, nous sommes tentés de conclure que bien des acétals n'ont aucune importance pour l'arôme du rhum et qu'un grand nombre d'entre eux, cités dans la littérature, sont des produits artificiels.


## RESUMEN


### LA FORMACIÓN DE ACETALES EN EL RON : ESTUDIO CINÉTICO

Se encuentra de cuando en cuando, en la literatura especializada, diversas referencias relativas a la importancia de los acetales, a título de componentes aromáticos del ron y otras bebidas alcoholizadas. La mayor parte de estas referencias se refieren a estudios cualitativos, ya que las concentraciones son mencionadas en contados casos. Por este motivo hemos puesto a punto un método de determinación por fotometría específica y sensible, y comparado los resultados obtenidos con aquellos proporcionados por la cromatografía en fase gaseosa.

Dado que la formación de acetatos es una formación de equilibrio, podría creerse que el contenido de acetaldehido presenta una relación particular con el porcentaje de alcohol en el ron. Contrariamente a esta hipótesis, hemos encontrado siempre desviaciones en relación con los datos calculados.

Nos hemos visto conducidos a informarnos con mayor precisión acerca de la cinética de esta reacción. Se ha demostrado que la velocidad de formación de los acetales depende principalmente de la formación de los semiacetales, que, con suma rapidez, se tranforman en acetales.

Fundándose en el conocimiento de las constantes de equilibrio de varios acetales, hemos calculado sus contenidos en el ron y determinado su umbral gustativo. En función de estos resultados, tenemos tendencia a concluir que numerosos acetales no presentan ninguna importancia para el aroma del ron y que un gran número de los mismos, mencionados en la literatura especializada, no son otra cosa sino productos artificiales.


## RIASSUNTO


### FORMAZIONE DI ACETALI NEL RUM : STUDIO CINETICO

Di tanto in tanto si trovano nella letteratura delle considerazioni sull'importanza degli acetali quali composti aromatici del rum e di altre bevande alcooliche. La maggior parte di queste considerazioni riguardano degli studi qualitativi giacchè le concentrazioni sono raramente indi-

cate. E' per questo motivo che abbiamo messo a punto un metodo di determinazione mediante fotometria specifica e sensibile e abbiamo confrontato i risultati ottenuti con quelli dati dalla gas-cromatografia.

Poichè la formazione di acetali è una reazione d'equilibrio, si potrebbe credere che il tenore di acetaldeide presenta una relazione particolare con la percentuale di alcool nel rum. Contrariamente a questa ipotesi, abbiamo sempre trovato delle differenze rispetto ai dati calcolati.

E' cos[1] dunque che siamo stati portati ad approfondire la cinetica di questa reazione. E' stato dimostrato che la velocità di formazione degli acetali dipende essenzialmente dalla formazione di semiacetali che si trasformano in brevissimo tempo in acetali.

Basandoci sulla conoscenza delle costanti di equilibrio di diversi acetali, abbiamo calcolato i loro tenori nel rum e determinato la loro soglia gustativa. Alla luce di questi risultati, siamo tentatidi concludere che molti acetali non hanno alcuna importanza per quanto riguarda l'aroma del rum e che un gran numero di essi, citati nella letteratura, sono dei prodotti artificiali.

## REFERENCES

Guymon J. F., Crowell E. A., 1963. Determination of aldehydes in wines and spirits by the direct bisulfite method. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **46**, 276-284.

Liebich H. M., Koenig W. A., Bayer E., 1970. Analysis of the flavor of rum by gas liquid chromatography and mass spectrometry. *J. Chromatogr. Sci.*, **8**, 527-533.

Maarse H., ten Noever de Brauw M. C., 1966. The analysis of volatile components of Jamaïca rum. *J. Food Sci.*, **31**, 951-955.

Peynaud E., Maurie A., 1938. L'acétal dans les eaux-de-vie. Son dosage volumétrique. *Bull. Int. Vin.*, (118), 42.

*Ann. Technol. agric.*, 1975, **24** (3-4), 383-390.

# THE RESEARCH AND DEVELOPMENT PROGRAM AT THE RUM PILOT PLANT OF THE AGRICULTURAL EXPERIMENT STATION OF THE UNIVERSITY OF PUERTO RICO FOR THE FULL UTILIZATION OF THE RUM DISTILLERY WASTES

A. E. MOLINI (1)

*Rum Pilot Plant,*
*Rio Pedras,*
*Puerto Rico 00928*

## SUMMARY

A large programme aiming at reducing the pollution due to rum washes has been undertaken since 1972. The concentrated washes can be used for cattle feed provided that a part of the potassium is removed as K and Ca complex sulphate. The wash once correctly diluted may also contribute to improve the nutritive value of coast waters and thus improve fish-breeding. Other attempts are made in view of the anaerobic digestion and the culture of microorganisms producing biomass or hydrolysing cellulose.

The rum industry of Puerto Rico has a large impact upon the economy of the Commonwealth. Sales of Puerto Rican rum account for 14 p. 100 of the monies collected by the island treasury, at the rate of more than $ 120 million yearly. Unfortunately, the production of one gallon of rum results in approximately 10 gals. of slops. More than 200 millions gals. of slops are produced and discharged yearly by the industry with a total demand of biological oxygen equivalent to the demand of the liquid effluent from a community of about one million inhabitants. The government agencies that look after the quality of the environment have decreed that the common practice of discharging the slops on land and coastal waters does not meet the environmental standards.

(1) Research work reported herein was performed with the colaboration of Isabel González, Diego I. Saavedra, Juan L. Aguiar Zulma de Ayala, Héctor García, Eduardo Rosado, Dr. T. R. Tosteson und Dr. F. Pagán.

No technology exists for the proper treatment of this effluent in an economic manner. The usual sanitary engineering practice of anaerobic digestion is economically prohibitive as proven by the projects sponsored by the Environmental Protection Agency at the Rum Pilot Plant and at the Bacardi Distillery. The large load coupled with the characteristically low digestion rates call for large treating facilities in areas where land is at a premium. The long distances from the distilleries to possible common facilities make these unattractive.

Realizing the magnitude of the problem, a vast research and development program was initiated at the end of 1972 at the Rum Pilot Plant of the Agricultural Experiment Station of the University of Puerto Rico to solve the problem. The effort embraces a positive attitude which considers the material a valuable resource. The program has been discussed widely with the scientific community of Puerto Rico looking for suggestions to improve the same. The program consists of no less than eighteen projects covering in detail such wide areas as : *a*) biological treatment of the material in multi-staged digestors to accelerate the process reactions 5 X to 10 X the usual ones ; *b*) chemical treatments with known coagulants ; *c*) effect of the slops upon the marine biota using as test members the microalgae *Chlorella vulgaris* and the bacterium *Photobacterium fischeri* ; *d*) its fertilizer and soil conditioner potential ; *e*) its potential as feed additive for beef, dairy, swine, and poultry ; *f*) its potential as fish feed ; *g*) its fermentation with yeasts, molds and marine bacteria to enrich its protein content ; *h*) development of the corresponding processes ; and *i*) its utilization as nutrient for cellulose hydrolyzing micro-organisms. The effort counts with the cooperation of various departments of the Agricultural Experiment Station, scientists from the Mayaguez Campus of the University of Puerto Rico and their graduate students.

The results up to now are encouraging. The utilization of the material as an additive for cattle feed has definite possibilities. We have learned how to remove 50 + p. 100 of its potassium salts, thus eliminating its laxative effect upon bovine cattle and opening up its use as cattle feed. Removal of the potassium salts open up their potential use as fertilizers at rates approaching 20 000 tons of $K_2SO_4$ per year. The effort with the marine biota indicate that, under the correct dilution conditions, it can serve to improve the nutrient level of our coastal waters, thus improving the fish population which at best is poor.

## SLOPS AND THE MARINE BIOTA

The main concern of the Environmental Protection Agency and its Puerto Rican counterpart, the Environmental Quality Board, about dumping the slops on the coastal sea waters, has to do with the accepted belief that this practice results in the pollution of the waters. Surprisingly, the fish catch in nearby waters is always better than would be expected were the material a pollutant. This controversy, in addition to the lack of adta about the effect of the slops upon the marine ecological cycle, prompted the initiation of a research effort dealing with the effect of the material upon marine micro-organisms and the utilization of the slops as a nutrient for feeding fish. It was desired to determine if the material was a pollutant or in reality a nutrient.

The research effort on the effect of the slops upon the marine micro-organisms is being conducted with the cooperation of Dr T. R. TOSTESON and his graduate students from the Department of Marine Sciences of the Mayaguez Campus. Four different fractions of the slops were prepared as follows : F-1, filtrate through 0.22 microns of the supernatant obtained after centrifugation of the crude slops at 25 000 *g*, 1 hour, 4°C ; F-2, the fraction obtained by dialysing F-1 *vs.* distilled water ; F-3, the precipitate obtained after treatment of F-1 with cold (4°C) ethanol and centrifugation at 18 000 *g*, 30 mn, 4°C and F-4, the supernatant obtained after centrifugation of F-3. The effect of these four fractions upon the marine microalgae *Chlorella gulvaris* (BEIJ) and the marine bacterium *Photobacterium fischeri* was explored. The results indicates that : F-1 appears to promote the development of the bacteria while inhibiting the development of the microalgae. The effect is greatly dependent upon the concentration. At concentrations of 1-2 g/liter, the opposite was indicated. F-2 appears to promote the development of the microalgae and inhibit the development of the bacteria. F-3 and F-4 both promote the development of the microalgae and the bacteria. F-3 promotes the adhesion of the microalgae to clean glass surfaces. This is a process associated with the ability of these cells to modify artificial surfaces so that they can support macroalgae and crustaceans. All of the fractions appear to inhibit the luminiscence of the bacteria.

TABLE I

*Ions and their concentrations in rum slop*

| Ion | p.p.m. | Percentage |
|---|---|---|
| Fe | 76.2 | 0.00762 |
| Zn | 3.5 | 0.00035 |
| Cu | 7.5 | 0.00075 |
| K | 8,380.0 | 0.8380 |
| Al | 25.0 | 0.0025 |
| Ca | 1,938.0 | 0.1938 |
| Mg | 1,412.0 | 0.1412 |
| P | 131.0 | 0.0131 |
| Cl | 27,500.0 | 2.75 |

Disposal of rum distillery wastes. Technical report for the Water Quality Office, Environmental Protection Agency, Project WPD-226-01 (September 1971). Rum Pilot Plant, Agricultural Experiment Station, University of P. R., Mayaguez Campus.

In addition we have found that the slops have a selective characteristic for marine bacteria when used as isolation media. F-1 and F-2 were used to isolate strains of marine bacteria from : *a*) mangrove roots at the tidal zone and completely immersed, *b*) rotting sea grass (Thallasis), *c*) gravel sediment and *d*) soft corals. The cultures have been transferred a number of times and isolated from one another. The strains that grow on the raw slops are being tested in aerobic fermentations to check their

growth for improving the protein content of the material. A total of twenty strains was isolated.

A second research effort was initiated to determine the nutritive value of the slops as fish feed with the cooperation of Dr. F. PAGÁN and his graduate students from the Department of Marine Sciences of the Mayaguez Campus. The experimental work was started during January 1974. The experiments are conducted in plastic pools 12 ft. diameter by 3 ft. deep installed at the Lajas Agricultural Sub-station using the cichlid fish, *Tilapia aurea*. Two graduate students from the Marine Sciences Department are working in this project for their Master in Sciences thesis. The preliminary results give a clear indication that the slops, as some of its components, i. e. the yeast mud, have a potential for fish cultivation purposes. The nutritive value is evident.

## ANAEROBIC DIGESTION OF SLOPS

The anaerobic digestion of sugar cane molasses distillery slops in the usual single step process will be too expensive a solution for the rum industry. The digestion rates are too slow and will require excessively large and expensive digestors. The possibility of accelerating the digestion many times over by separating the mechanism into the acid and methanic steps, was very intriguing and an effort was initiated in this area.

TABLE 2

*Average composition of slops from rum distilleries in Puerto-Rico*

| Item of analysis | Range of values | Average |
|---|---|---|
| 1. pH | 4.4-5.9 | 4.7 |
| 2. 5 days (20°C) BOD (p.p.m.) | 19,500-34,750 | 28,620 |
| 3. Chemical oxygen demand (p.p.m.) | 79,360-111,450 | 92,224 |
| 4. Total sugars (p. 100) by volume | 1,0-2.5 | 1.6 |
| 5. Volatile acids (p.p.m.) | 620-2,631 | 1,287 |
| 6. Total solids (p.p.m.) | 72,280-106,800 | 89,273 |
| 7. Volatile solids (p.p.m.) | 47,360-75,880 | 63,982 |
| 8. Fixed solids (p.p.m.) (ash) | 16,520-37,480 | 25,291 |
| 9. Suspended solids (p.p.m.) | 960-7,625 | 3,224 |
| 10. Protein (p. 100 weight) | | 0.7 |

Disposal of rum distillery wastes. Technical report for the Water Quality Office, Environmental Protection Agency, Project WPD-226-01, (Setember 1971). Rum Pilot Plant, Agricultural Experiment Station, University of P. R., Mayaguez Campus.

The laboratory scale anaerobic digestion train consists of 3 one-gallon digestors connected in series to separate the acid and the methanic steps. A very stable anaerobic fermentation is obtained at 2 X the usual digestion rates. The acidity is con-

trolled in the first digestor (acid fermentation) with 75 meq NaOH/gal/day. It is not necessary to control the acidity in the other two digestors. The bacterial control is very reproductible. The best temperature range is 30°-35°C.

As much as 90 p. 100 methane has been obtained with digestion rates 2 X the usual ones of 0.18 lb. of BOD/day/ft³. The highest $CO_2$ production is obtained in digestor I, while the highest $CH_4$ production is obtained from digestor III. The pH in digestor III fluctuates daily between 5.5 pH (immediately after feeding) to 7.5 pH before feeding.

The work with the laboratory staged digestors confirmed that it was possible to accelerate the disgestion rate to levels that might make it economically attractive. These results lead us to increase the scale of experimentation. A three stage train of fermentors, each with a capacity of 30 gals., was installed and tests are underway.

## UTILIZATION OF THE SLOPS IN AGRICULTURE

A literature survey revealed that the distillery wastes from molasses fermentation are useful as cattle feed provided the slop is concentrated to about 55°Bx to prevent its decomposition during storage. Also, the potassium content must be reduced to minimize the laxative effect that the salts have upon ruminants. Eastern european

TABLE 3

*Contents of essential amino acids of dried molasses-slops*

| Amino acid | Percentage wght of sample | Percentage wght of crude protein |
|---|---|---|
| Crude protein | 7.85 | |
| Arginine | 0.041 | 0.52 |
| Histidine | 0.037 | 0.47 |
| Isoleucine | 0.12 | 1.53 |
| Leucine | 0.15 | 1.91 |
| Lysine | 0.074 | 0.94 |
| Methionine | 0.057 | 0.73 |
| Phenylalanine | 0.11 | 1.40 |
| Threonine | 0.14 | 1.79 |
| Tryptophan | 0.41 | 1.41 |
| Valine | 0.18 | 2.29 |

Source : Lyman C. M. ; Kuiken K. A., Hale F., 1956. *J. agric. Food Chem.*, 4, 1008.

sources equate the concentrated material obtained from the beet molasses fermentation wastes to pure beet molasses at a rate of 1.5 kg of the concentrated waste to 1 kg of the molasses as a supplement in the daily ration of the cattle. The literature also shows that dehydrated slops can be incorporated in the daily ration of poultry at a rate of 20 p. 100 day of the ration. Certainly, as the possible utilization

of the slops as cattle feed became apparent, research along the following areas was initiated : reduction of the potassium ion content to reduce its laxative effect on animals ; concentration of the slops to improve its keeping property under storage; dehydration of the material to be used in poultry ; aerobic fermentation to enrich its protein content. These areas were extended along the lines on equipment development and design to be able to specify future installations.

An atmospheric pressure evaporator with a capacity to evaporate water at rates of 25 gal/hr. was juri-rigged at the Rum Pilot Plant using the reboiler from the main distillation column as the thermo-syphon and two of the old fermentors. The unit was used to prepare the initial samples of concentrated slops (3 400 gal of 55°Bx) for projects dealing with the evaluation presently being conducted of the material as cattle feed, pork feed, chicken feed and fish feed.

The raw slops can be concentrated to densities higher than 55°Bx. The evaporation must be performed at temperatures lower than 220°F to minimize the degradation of the protein (16 p. 100 degradation at 220°F, 30 p. 100 at 230°F and, 35 p. 100 at 240°F) and the formation of scale on the heat transfer surfaces. The scale analyzed 7. 3 p. 100 weight K, 9. 82 p. 100 weight Ca, 31.1 p. 100 weight $SO_4$ and 56.14 p. 100 weight ashes.

Our effort to desalt the slops has given very encouraging results. Preliminary experiments have shown reductions of 50 p. 100 of the potassium ions. The technique involve precipitation of the potassium as the complex salt calcium-potassium-sulfate at app. 2.2 pH and 50°Bx at 90°C.

TABLE 4

*Vitamin content of molasses-slops*

| Wet basis | mg per lb |
|---|---|
| Nicotinic acid | 9.53 |
| Pyridoxine | 13.62 |
| Pantothenic acid | 17.71 |
| Biotin | 0.68 |
| Folic acide | 0.135 |
| Riboflavin | 3.63 |

Source : UNDERKOFLER L. A., HICKEY R. J., 1954. *Industrial fermentations,* vol. 1, Chemical Publishing Co. 212 Fifth Ave. New York, N. Y., U. S. A., 1954.

The rum distillery wastes contains about 0.7 p. 100 weight of nitrogen expressed as protein. The concentrated material (55°Bx) contains about 7 p. 100 weight of nitrogen expressed as protein originating from the yeast of the alcoholic fermentations. Fermentation of the sugars remaining after the alcoholic fermentations with yeasts or moulds would yield a raw fermented slop with a protein content of about 1.5 p. 100 weight which would result in a 55°Bx concentrate of 15 p. 100 weight protein. The dehydrated material would be about 30 p. 100 weight protein.

Fodder yeast can be produced using the slops as raw material. The material contain an average of 1-2 p. 100 weight of sugars left over from the alcoholic fermentation. *Candida utilis* and *Torulopsis candida* yeasts can utilize these sugars. Exploratory tests yielded about 20 g of dry yeast/liter. Nutrient levels must be adjusted to .05 p. 100 N and .15 P. A graduate chemical engineering student is investigating the fermentation of the slops with *Torula* and *Candida* yeasts in an effort to enrich the protein content of the material. Growth experiments with moulds show that various strains of *Aspergillus* have a voracious apetite for the material

We are very confident that given the time and the funds to complete this program, we will arrive at the most desirable solution to the problem from an ecological and economical point of view.

## RÉSUMÉ


### PROGRAMME DE RECHERCHE ET DÉVELOPPEMENT POUR L'UTILISATION INTÉGRALE DES EAUX RÉSIDUAIRES DE DISTILLERIE DE RHUM EFFECTUÉ A L'ATELIER PILOTE DU RHUM DE LA STATION D'EXPÉRIMENTATION AGRICOLE DE L'UNIVERSITÉ DE PORTO-RICO

En 1972, un vaste programme a été entrepris pour réduire la pollution par les vinasses de rhum. L'utilisation des vinasses concentrées est possible dans l'alimentation du bétail à condition d'éliminer une partie du potassium sous forme de sulfate complexe de K et Ca. La vinasse correctement diluée peut aussi servir à améliorer la valeur nutritive des eaux côtières en vue d'améliorer la faune piscicole. D'autres essais sont entrepris pour la digestion anaérobie et la culture de micro-organismes producteurs de biomasse ou hydrolysant la cellulose.


## RESUMEN


### PROGRAMA DE INVESTIGACION Y DESARROLLO PARA LA UTILIZACIÓN INTEGRAL DE LAS AGUAS RESIDUALES DE DESTILACIÓN DEL RON, EFECTUADO EN EL TALLER PILOTO DEL RON EN LA ESTACIÓN DE EXPERIMENTACIÓN AGRÍCOLA DE LA UNIVERSIDAD DE PUERTO RICO

En 1972, se ha emprendido un vasto programa para reducir la contaminación por las vinazas del ron.

La utilización de las vinazas concentradas es siempre posible en la alimentación del ganado, con la condición de eliminar una parte del potasio, en forma de sulfato complejo de y de Ca. La vinaza correctamente diluida puede servir también para mejorar el valor nutritivo de las aguas coteras, con objeto de mejorar la fauna piscícola. Han sido emprendidos otros ensayos para conseguir la digestión anaerobia, así como el cultivo de los microorganismos productores de biomasa o que hidrolice la celulosa.

## RIASSUNTO

### PROGRAMMA DI RICERCA E DI SVILUPPO PER L'USO INTEGRALE DELLE ACQUE RESIDUE DELLE DISTILLERIE DI RUM, ELABORATO NEL LABORATORIO PILOTA DEL RUM DELLA STAZIONE SPERIMENTALE AGRICOLA DELL'UNIVERSITA DI PORTO-RICO

Per ridurre l'inquinamento causato dalle vinacce del rum, è stato elaborato nel 1972 un vasto programma di lavori. Le vinacce concentrate possono essere impiegate per l'alimentazione del bestiame a condizione di eliminare una parte del potassio sotto forma di solfato complesso di K e Ca. Opportunamente diluita, la vinaccia puo' dunque servire a migliorare il valore nutritivo delle acque costiere allo scopo di sviluppare la fauna piscicola. Altre prove sono effettuate per la digestione anaerobica e la coltura di microorganismi produttori di biomassa o per l'idrolisi della cellulosa.

*Ann. Technol. agric.*, 1975, **24** (3-4), 391-396.

# THE RUM PILOT PLANT OF THE AGRICULTURAL EXPERIMENT STATION OF THE UNIVERSITY OF PUERTO RICO : PAST, PRESENT, FUTURE

A. E. MOLINI [1]

*Rum Pilot Plant,*
*Rio Piedras,*
*Puerto Rico 00928*

SUMMARY

The rum pilot plant was created in 1953 in order to support the rum industry in Porto-Rico and to maintain the quality of its products at a high level. Yeasts strains able to ferment up to 14° of alcohol have been selected. The antiseptics and antibiotics have been used to secure pure fermentations. The high-proof distillation proved to be suitable for the production of high quality light-bodied rum. The irreplaceable role of wood in aging has been stated. Modern methods have been suggested for rum analysis.

The economic importance of the rum industry for the Commonwealth of Puerte Rico is a well established fact. Rum revenue, which in the 1973-1974 fiscal year alono amounted to $ 120 millions, continues to make its outstanding contribution to the well being of the Puerto Rican people through the industrialization program of the Commonwealth government and the betterment of educational, cultural, agricultural, health, and transportation facilities throughout the island. Total revenues collected by the island treasary exceeded the $ 1.0 billion mark during early 1974. There is still much work to be done and, if higher and better standards of living in Puerto Rico are to become a reality, the rum industry must continue doing its share. The

(1) Dr. A. E. Molini wishes to acknowledge the work of the following personnel of the Rum Pilot Plant : Aguiar, Juan. L.; Aguilera Flores, Cruz; Alfonso Ribera, Héctor; Batiz Hernández, Heriberto; Belardo Yadós, Amador; Brau, Herminio M.; Calderón Tomei, Benjamín; Camacho, Belén M.; De Ayala Gallisá, Zulma; Fernández de Murphy, Nivia; García Porrata, Asdrúbal; García Morin, Manuel; García Ortiz, Héctor; Lindegren, Carl C.; Medina, María; Montalvo, Milagros; Morell de González, Isabel; Rodríguez Benítez, Víctor; Rosado González, Eduardo; Saavedra Zamot, Diego; Sánchez de Torres, Calixta and Soltero, Elena.

product has to compete in the United States and world markets with other alcoholic beverages of high quality and preferences. For these reasons, it is absolutely necessary to keep improving the quality of the Puerto Rican rums. To do so, Puerto Rico must continue building up a sound reputation for its rums based on quality as indicated by excellence standards. It is thus pertinent for the rum industry to have at its disposal the most accurate and precise techniques possible to control and improve the quality of the product.

The demand for Puerto Rican rums in the continental markets increased rapidly during the second world war. Unexpected sales levels were reached because of the virtual absence of whisky from the market. Hence, the reserves available at the warehouses of the rum manufacturers were exhausted in a short time. Properly aged rum was no longer available and rum with little or no aging appeared in the market. These sales seriously harmed the prestige of Puerto Rican rums. After the war, when whiskey, as well as other beverages became available, the sales of Puerto Rican rum in the continental market dropped markedly reaching levels even lower than those prevailing before the war. The Puerto Rican Government promptly recognized that to recover and maintain a reasonable portion of the continental market for strong alcoholic beverages, it was necessary to offer a product of high quality. Research work at the Agricultural Experiment Station dating since 1938 and done by Arroyo indicated the route to achieve good rum quality. A research effort was initiated in 1945 to ascertain the leads developed by Arroyo. These were corroborated by 1947. Because of these reasons, the Rum Pilot Plant of the Agricultural Experiment Station of the University of Puerto Rico was specially created by an act of the legislature of Puerto Rico, and was officially opened on march 18, 1953 with the specific objective of developing and providing the technical expertise required to place and maintain the industry and the quality of its product in a healthy position. The establishment of the Rum Pilot Plant opened a new era on the manufacture of rum.

## WHAT IS THE RUM PILOT PLANT ?

The rum pilot plant is an experimental rum distillery provided with the most modern equipment and facilities of the day for the production of fermentation alcohol and rum. The fermentation and distillation units are flexible, so that experiments in the various fermentative and distillation processes known can be readily conducted. The laboratories are well equipped with all the instrumentation required for the application of the most modern techniques to studies on rum and alcohol.

Scientific investigations are conducted in all the phases comprising the manufacture of rum and alcohols by the fermentation of sugarcane molasses. The knowledge obtained in these studies is promptly transmitted to the rum industry of Puerto Rico. The industry has always been free to utilize to their best advantage the information developed at the Rum Pilot Plant. The Rum Pilot Plant does not have any regulatory function over the industry.

Government agencies utilize the services of the Rum Pilot Plant on matters related to the rum and alcohol industry.

## ACHIEVEMENTS OF THE RUM PILOT PLANT

The following achievements of the Rum Pilot Plant can be mentioned :

### 1. — *Yeast strains*

The importance of conducting the alcoholic fermentation with pure yeast cultures was demonstrated in semi-commercial scales. Alcohol concentrations as high as 14 p. 100 by volume at fermentation efficiencies higher than 90 p. 100 were achieved. A collection of yeast cultures was developed from strains obtained from institutions throughout the world, isolation from wild sources and from strains developed by induced mutations and artificial hybridization. The yeast collection of the Rum Pilot Plant is available to the rum industry of Puerto Rico.

### 2. — *Fermentation processes*

The conventional batch fermentation process was defined by establishing the optimum operating conditions of the several process variables. The incremental and continuous fermentation processes were investigated. The use of antibiotics and chemicals was demonstrated for inhibiting contaminant bacteria and other microorganisms. Data was obtained on the formation of congeners during the fermen tation. The results indicated that most of the congeners were produced during the early states of the fermentation process.

### 3. — *Distillation*

Studies were conducted on the various distillation processes of the alcoholic industry. Procedures were established for the start up and the continuous operation of distillation columns to produce high quality distillates, permitting the highest possible selection of the congeners. There is no justification for fusel oil in distillates other than the inability to perform the distillation in an efficient manner. The convenience of distilling at the highest possible proof was demonstrated for light rums. Proper selection of the levels of operational variables permitted the selective separation of congeneric substances to desirable extents, while reducing the content of fusel oil and unidentified tail substances in the main product to a minimum. It was also demonstrated that excessive concentrations of fusel oil destroys the good quality of light bodied rums. Furthermore, it was demonstrated that there is no justification for the existence of legal provisions which establish that the distillate shall be produced at an alcoholic concentration below a certain specified limit, in order to be classified as an alcoholic beverage and that neither must it have a minimum level of congeners in order to be classified as rum.

### 4. — *Automatic controls*

An instrumentation system was developed for the automatic control of the distillation which by itself permitted the operation of the distillation columns in the most reliable way to get good quality distillates consistently.

5. — *Aging*

Studies were conducted on the changes that occur in rums during the course of the natural aging process in barrels. The effects of various types of oak barrels on the aging of rums were studied, as well as the effect of adding different substances to the rums in the barrels at the beginning of the aging processes, such as activated carbon, oak chips, wood extracts, etc. The results conclusively demonstrated that none of these process artifacts by themselves can supplant natural aging in oak barrels to obtain rum of the highest quality.

Attempts to accelerate the natural aging of rum in oak barrels by conducting it at temperatures higher than ambient were effected. However, serious economic considerations and the inherent potential explosive nature of the atmosphere inside the warehouses have curtailed our effort in this area.

6. — *Processing*

The finishing operations of rum before bottling were defined by establishing the effect of such substances as activated carbons, filtering aids, coloring and flavoring agents, etc.

7. — *Analytical methods*

Detailed studies were conducted to select and develop a set of standard analytical methods to be used by the alcohol industry. We can assert that the methods of the Rum Pilot Plant are more sensitive and precise than the conventional methods available in the technical literature.

8. — *Organoleptic tests*

By the proper selection of a tasting panel, we are finally beginning to corroborate the results of organoleptic tests with chemical analyses.

9. — *Quality standards*

The Puerto Rico rum industry was provided with a set of quality standards which serve as a reference line for excellent rum quality.

10. — *Services to the industry*

Manufacturers of Puerto Rican rums have utilized free of charge the services offered by the Rum Pilot Plant such as : design and selection of equipment, development of special processes, definition of operating conditions, selection of control systems, training of skilled operators and technical personnel, analysis of samples, evaluation of the quality of the finished product, and general advice on all matters, including economic considerations. One very important service is to purify and revitalize yeast strains from the private yeast collection of the rum manufacturers.

Without any doubt, the accomplishments of the Rum Pilot Plant have had a marked effect on the economic and social well being of Puerto Rico and its rum

industry. At present, the contribution to the treasury amounts to more than $ 130 millions a year with levels higher than $ 150 millions a year predicted for the near future. To keep abreast of the industry, it is logical to re-structure the efforts and objectives of the rum pilot plant. The rum industry of Puerto Rico has made the transition from an art to a scientific and technical endeavour. The Rum Pilot Plant cannot expect to lead it in all phases of the process thus we have chosen for the near term, to concentrate our efforts in such areas as :

1. Definition of the factors that determine the fermentability of molasses. For this purpose, we have initiated a program to characterize the molasses from all sugar mills in Puerto Rico and from some foreign countries.

2. « Finger printing » the minor constituents of rum. We aim to be able to identify the more than eighty components detectable by chromatographic techniques and to perform these analysis routinely.

3. Utilization of the rum distillery wastes in an economic manner for the benefit of Puerto Rico and the rum industry.

4. Utilization of the fermentation expertise gained during the past 20 years into such areas as the development of low cost sources of biomass or single cell protein and the development of easily fermentable or digestible carbohydrates for animal feeds.

We definitely envision the utilization of the facilities, resources and expertise available at the Rum Pilot Plant for the further betterment of Puerto Rico.


## RÉSUMÉ

### L'USINE-PILOTE DE FABRICATION DU RHUM DE LA STATION EXPÉRIMENTALE AGRICOLE DE L'UNIVERSITÉ DE PORTO-RICO ; PASSÉ, PRÉSENT ET AVENIR.

Atelier-pilote pour le rhum de la Station d'Expérimentation Agricole de l'Université de Puerto-Rico : Passé, Présent, Futur.

L'atelier expérimental a été créé en 1953 pour soutenir l'industrie du rhum à Puerto-Rico et pour maintenir à un haut niveau la qualité de ses produits. Des souches de levures ont été sélectionnées pour fermenter jusqu'à 14° d'alcool. Les antiseptiques et les antibiotiques ont été utilisés pour maintenir des fermentations pures. La distillation à haut degré est apparue convenable pour produire du rhum léger de bonne qualité. Le rôle irremplaçable du bois dans le vieillissement a été reconnu. Des méthodes modernes pour l'analyse des rhums ont été proposées.



## RESUMEN

### EL TALLER PILOTO PARA EL RON, EN LA ESTACIÓN DE EXPERIMENTACIÓN AGRÍCOLA DE PUERTO RICO : PASADO, PRESENTE Y FUTURO

El taller experimental ha sido fundado en 1953, con objeto de servir de apoyo a la industria del ron de Puerto Rico, así como para mantener un elevado nivel de calidad de sus productos. Han sido seleccionadas estirpes de levaduras para fermentar hasta 14° de alcohol. Los antisépticos

y antibióticos han sido utilizados para mantener las fermentaciones puras. La destilación de grado elevado ha parecido constituir un procedimiento conveniente para producir ron ligero de calidad correcta. El papel insustituible de la madera en el añejamiento ha sido reconocido. Han sido propuestos métodos modernos para el análisis de los rones.


## RIASSUNTO

### IL LABORATORIO PILOTA DEL RUM DELLA STAZIONE SPERIMENTALE AGRICOLA DELL'UNIVERSITÀ DI PORTO-RICO: PASSATO, PRESENTE, FUTURO

Il laboratorio sperimentale è stato creato nel 1953 per aiutare l'industria del rum a Porto-Rico e per mantenere a un livello elevato la qualità dei suoi prodotti. Delle specie di lieviti sono state selezionate e lasciate fermentare fino a 14° di alcool. Gli antisettici e gli antibiotici sono stati impiegati per mantenere delle fermentazioni pure. La distillazione ad alto grado è apparsa conveniente per produrre del rum leggero di buona qualità. E' stato riconosciuta che il legno ha un ruolo insostituibile per l'invecchiamento e sono stati proposti infine nuovi metodi moderni per l'analisi dei rums.

*Ann. Technol. agric.*, 1975, **24** (3-4), 397-410.

# POSSIBILITIES OF UTILIZATION OF BUTYRIC ACID BACTERIA FOR RUM MAKING

S. NEMOTO

*Godo Shusei Co., Ltd.,*
*10 Ginza, Chuo-ku, Tokyo (Japon)*

## SUMMARY

Two methods of production of heavy rum by utilizing butyric acid bacteria have been studied.

Butyric acid bacteria could not ferment symbiotically with rum yeast *Shizosaccharomyces pombe* in molasses medium containing more than 14 p. 100 glucose.

Addition of 15-30 p. 100 of high-acid mash fermented by butyric acid bacteria to rum mash was effective for increasing acid content and enriching rum flavor, but ester content increased just a little.

Distillation of fermented rum mash including high-acid mash at low pH, adjusted to pH = 2, was available. Acid content increased 4-6 times and ester content 2 times compared with distillate of non-adjusted, higher pH mash. Lusson Giraid number of fine distillate from non-treated mash is 135, while from adjusted mash is 384.

By lowering pH of mash, butyric acid is let free, and during distillation with alcohol, they combine to form ester.

From analytical results, the distillate seemed to be good quality as heavy rum, but it is necessary to confirm by tasting after aging for a long time if this distillate becomes a good rum or not.

## INTRODUCTION

The production and consumption of alcohol in Japan have reached a considerable amount. In the past, domestic sweet potato was mainly used as a raw material, but now, imported molasses and crude alcohol take the place of sweet potato. Table 1, shows alcohol production and its raw materials during the recent four years in Japan. Sugar cane is not cultivated in Japan, except Okinawa islands, the southern part of the country. Because of these conditions, it is difficult to get fresh molasses. Furthermore, Japanese does not drink rum so much.

### TABLE I

*Alcohol production and its raw material in Japan*

| Year | | 1971 | | 1972 | | 1973 | | 1974 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Alcohol production | | (kl) 249,494 | (%) 100 | (kl) 259,041 | (%) 100 | (kl) 271,110 | (%) 100 | (kl) 260,718 | (%) 100 |
| Raw materials | Molasses | 114,850 (368,441 t) | 46.0 | 112,224 (360,015 t) | 43.3 | 104,551 (314,448 t) | 38.6 | 105,780 339,342 t) | 40.6 |
| | Hightest Molasses | 58,711 (137,223 t) | 23.5 | 55,043 (128,649 t) | 21.2 | 11,550 (26,998 t) | 4.3 | 62 (144 t) | 0 |
| | Alcohol Crude | | | 21,969 (25,486 kl) | 8.5 | 92,669 (107,505 kl) | 34.2 | 113,374 (131,374 kl) | 43.5 |
| | Others | 75,933 | 30.5 | 69,805 | 27.0 | 62,340 | 22.9 | 41,502 | 15.9 |

( ) : Material in ton or kl.
From the *Bulletin of Japan Molasses Association*, 1972-1975.

### TABLE 2

*Production of rum in Japan* (1954-1973)

| Year | Production (kl) | Year | Production (kl) |
|---|---|---|---|
| 1954 | 10.8 | 1964 | 369.3 |
| 1955 | 15.8 | 1965 | 376.8 |
| 1956 | 31.5 | 1966 | 502.8 |
| 1957 | 66.2 | 1967 | 675.2 |
| 1958 | 117.2 | 1968 | 735.3 |
| 1959 | 119.0 | 1969 | 765.6 |
| 1960 | 134.0 | 1970 | 794.1 |
| 1961 | 175.1 | 1971 | 839.5 |
| 1962 | 270.3 | 1972 | 1 012.0 |
| 1963 | 278.1 | 1973 | 1 071.0 |

From the wine, *Spirits and provisons Monthly Statistics*, 1955-1974.

After the Second World War, goods for daily use were insufficient and their qualities were poor. Materials of confectionary, such as butter and wheat flour, were not an exception. Heavy rum was used in order to improve the taste and flavor of cake made from those bad materials. Thus, rum has been developed not as a drink, but as a confectionary use, and in Japan heavy rum was wanted. Production of rum in Japan (1954-1973) is shown in table 2. We had to study rum making under very different condition from West India.

According to ARROYO (1942), acid forming bacteria, such as acetic and butyric acid bacteria, play an important roll for making heavy type rum. We studied to utilize butyric acid bacteria to make rum containing a large amount of acids and esters. Two methods to utilize butyric acid bacteria, are thought.

1. Rum mash is fermented symbiotically with rum yeast and butyric acid bacteria to form a large quantity of acid and ester ;

2. High-acid mash acidified by butyric acid bacteria is added to rum mash and fermented with rum yeast, and then distillated.

This paper deals with these two methods and their results are reported.

## MATERIALS AND METHODS

### 1. — *Microorganisms*

Butyric acid bacteria : *Cl. butyricum* ATCC-6015 was selected out of 4 strains.
Yeast : *Shizosaccharomyces pombe*. This yeast is used in usual production of our rum factory.

### 2. — *Composition of medium*

| | |
|---|---|
| Molasses ........ | 3 p. 100 as glucose |
| $(NH_4)^2SO_4$ ...... | 0.15 p. 100 |
| $KH^2PO_4$ ....... | 0.2 p. 100 |
| $CaCO^3$ .......... | 0.1 p. 100 |
| pH ............ | 6.0-6.2 |

Composition of medium was decided after some experiments.

### 3. — *Cultivation condition of butyric acid bacteria*

Cultivation temperature : 30°C.
Incubation of seed culture : 24 hours.

### 4. — *Analysis*

Analysis was carried out by methods of A.O.A.C.

### 5. — *Culture method of butyric acid bacteria*

Sand culture of *Cl. butyricum* ATCC-6015 was added to sterilized medium in a 10 ml test tube. It was incubtated for 24 h in anaerobic condition as shown on figure 1.

The contents of the tube were used to inocule 70-80 ml of medium in 100 ml erlenmeyer flask. This was incubated for 24 h and provided inoculum for 700-800 ml of sterilized mash of the same composition. After incubating 24 h, this culture was used for the experiments.

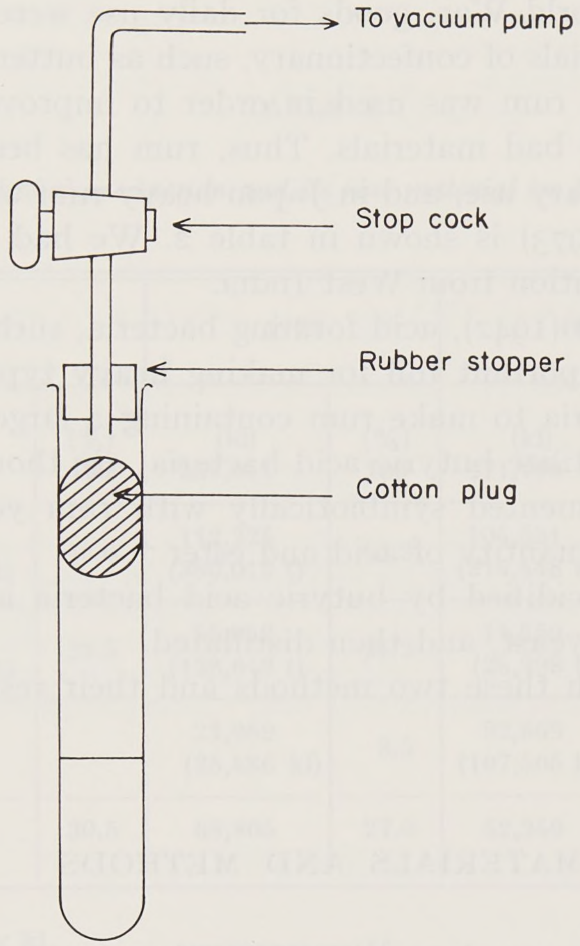



FIG. 1. — *Culture method of butyric acid bacteria*

6. — *Gas chromatography* (Hitachi K-53 gas)

Chromatograph was used. Experimental parameters were as follows.

Column : 2 m ; liquid phase : PEG 1,500 5 p. 100.
Support : Chromosorb W 60/80 mesh.
Column temp. : isothermal 50°C.
Inject temp. : 120°C. Carrier gas : $N^2$ 0.5 kg/cm².
Detector : FID ; $H^2$ gas flow : 0.6 kg/cm².
Air flow : 2 kg/cm² ; sensitivity : × 20.
Chart speed : 20 mm/mn.

## RESULTS

### I. — *Influence of sugar and alcohol concentration on butyric acid fermentation*

Rum mash contains comparatively high concentration of sugar before fermentation, and alcohol after fermentation. So, it is necessary to examine if butyric acid bacteria could ferment and form volatile acid in such a medium as rum mash.

#### 1. *Influence of sugar concentration on butyric acid fermentation.*

At first, the influence of sugar concentration on the formation of acid was examined. Sugar concentration of molasses media was adjusted from 2.5 to 15.3 p. 100, to which, seed culture of butyric acid was inoculated and volatile acid was determined after 7 days.

As shown in figure 2, optimum sugar concentration was about 5 p. 100, then acid was decreased and could not be formed at sugar concentration of 15.3 p. 100.

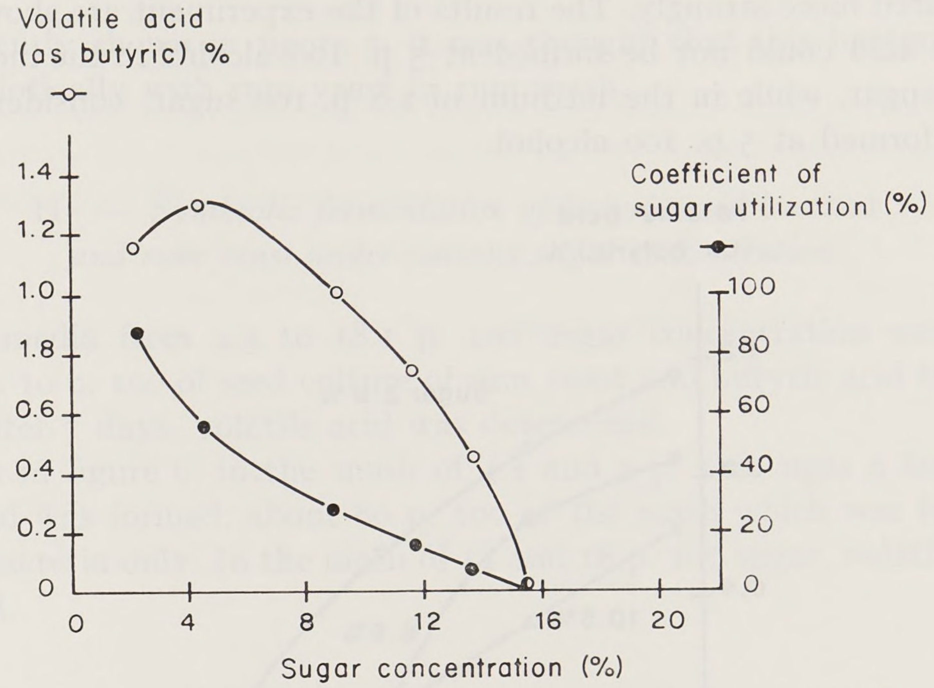



FIG. 2. — *Influence of sugar concentration of butyric acid fermentation*

2. *Influence of alcohol concentration on butyric acid fermentation.*

To examine the influence of alcohol, molasses media containing alcohol from 2.5 to 10 p. 100 were prepared by adding alcohol to molasses media. Volatile acid was determined after incubation bacteria for 7 days.

As shown in figure 3, alcohol strongly inhibited acid formation. Acid was decreased as alcohol concentration increased, and could not be formed at 7.5 p. 100 alcohol.

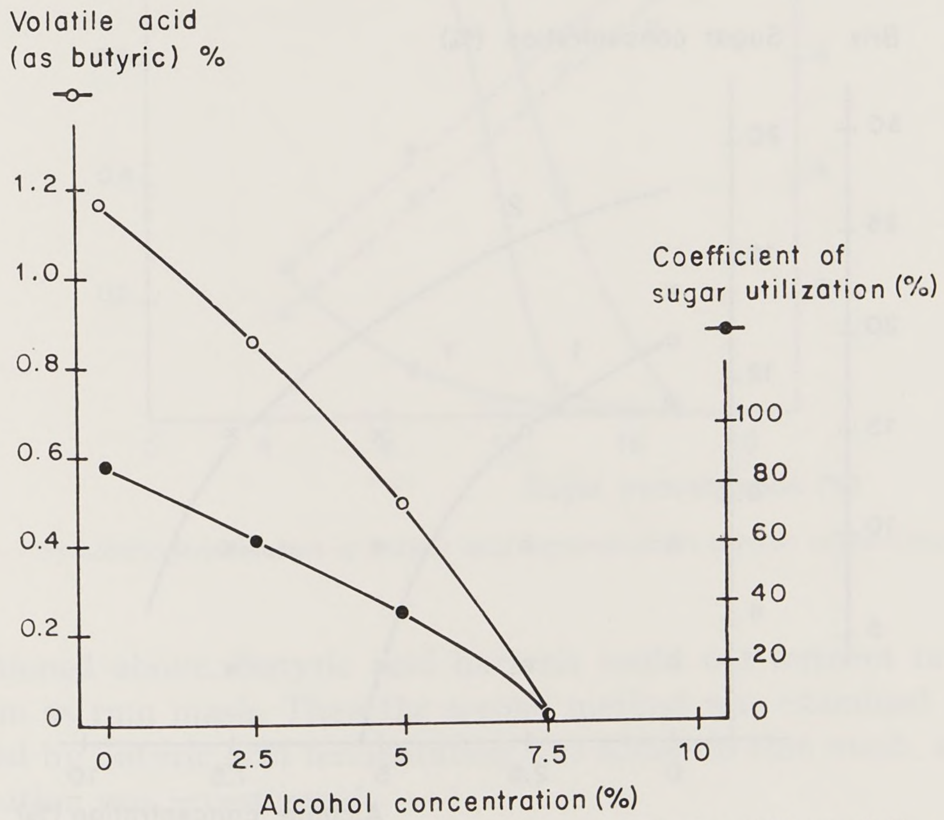



FIG. 3. — *Influence of alcohol concentration on butyric acid fermentation*

3. *Influence of sugar and alcohol concentration on butyric acid fermentation.*

When both sugar and alcohol were contained, the influence of those constituents appeared more strongly. The results of the experiment are shown in figure 4.

Volatile acid could not be formed at 5 p. 100 alcohol in the media of 6.9 and 10.5 p. 100 sugar, while in the medium of 2.8 p. 100 sugar, considerable quantity of acid was formed at 5 p. 100 alcohol.

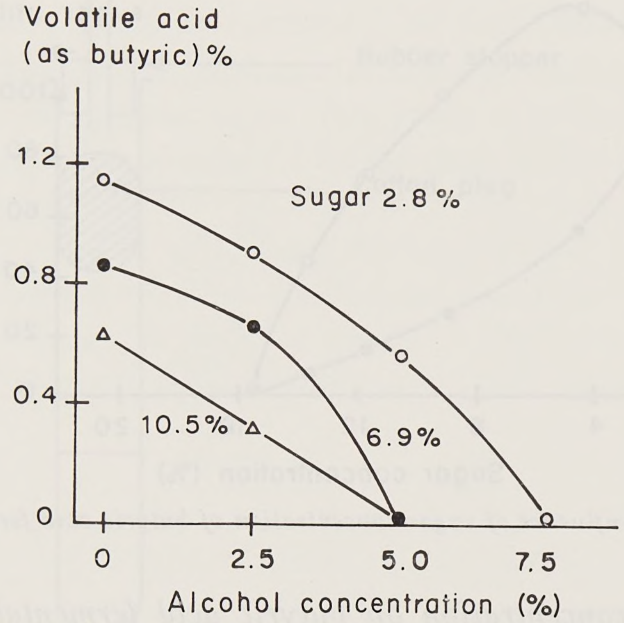



FIG. 4. — *Influence of sugar and alcohol concentration on butyric acid fermentation*

4. *Fermentable range of butyric acid bacteria under various alcohol and sugar concentration.*

Results of above experiments, are shown in figure 5. The inside of curve 1 is the range of sugar and alcohol concentration that butyric acid bacteria

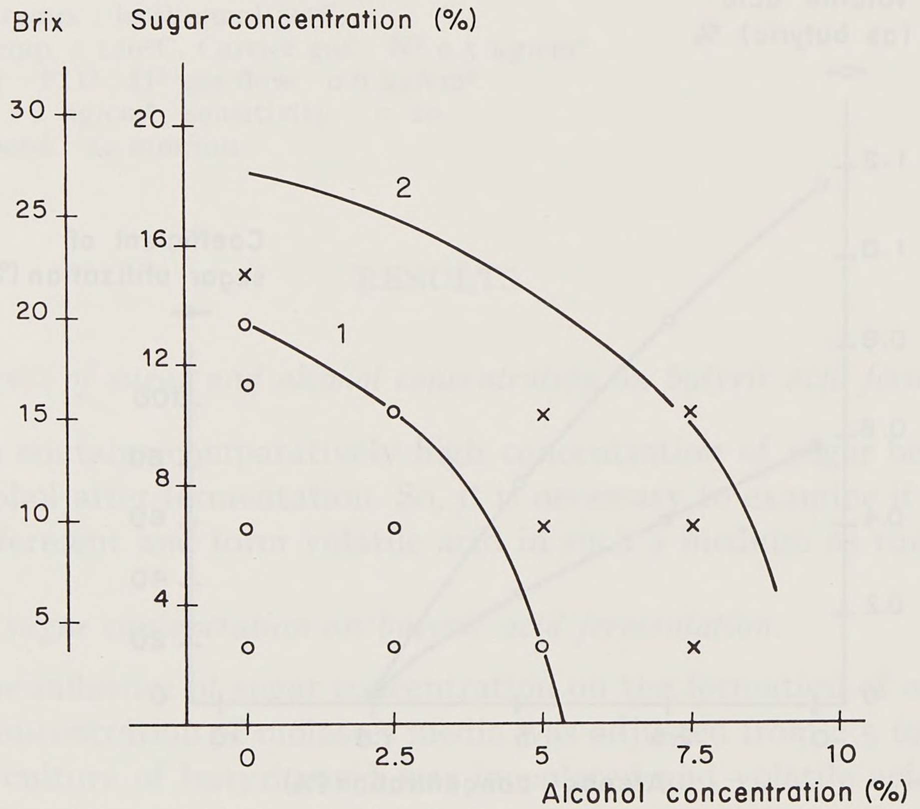



FIG. 5. — *Fermentable range of butyric acid bacteria under various alcohol and sugar concentration*

could ferment and form butyric acid. On the other hand, curve 2 shows sugar and alcohol concentration of usual rum mash during fermentation in our factory.

As apparently shown in figure 5, it was thought that this bacteria could not ferment symbiotically with rum yeast in rum mash.

### II. — *Symbiotic fermentation of butyric acid bacteria and rum yeast under various sugar concentration*

Molasses media from 4.5 to 18.1 p. 100 sugar concentration were prepared, to which, each 10 p. 100 of seed culture of rum yeast and butyric acid bacteria were inoculated. After 7 days, volatile acid was determined.

As shown in figure 6, in the mash of 4.4 and 9 p. 100 sugar a large quantity of volatile acid was formed, about 80 p. 100 of the mash which was fermented by butyric acid bacteria only. In the mash of 14 and 18 p. 100 sugar, volatile acid could not be formed.

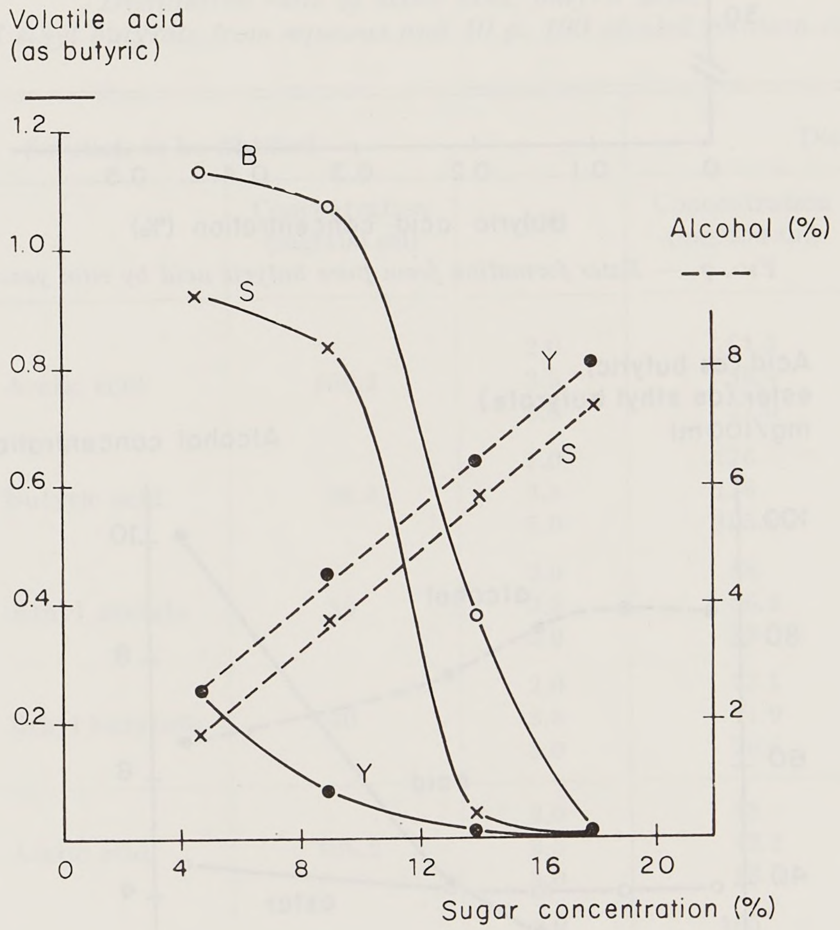



FIG. 6. — *Symbiotic fermentation of butyric acid bacteria under various sugar concentration*

As mentioned above, butyric acid bacteria could not ferment in such a high sugar medium as rum mash. Then the second method was examined : a high acid mash acidified by butyric acid fermentation was added to rum mash, and the effect onester formation was investigated.

### III. — *Ester formation from pure butyric acid by rum yeast and effect of addition of butyric acid bacteria culture to rum mash*

1. *Ester formation from pure butyric acid by rum yeast.*

At first, in order to confirm how much ester was formed from butyric acid and alcohol during fermentation by rum yeast, pure butyric acid was added to rum mash and after fermented for 7 days ester was determined. Figure 7 shows the results. Ester was a little bit increased compared with control.

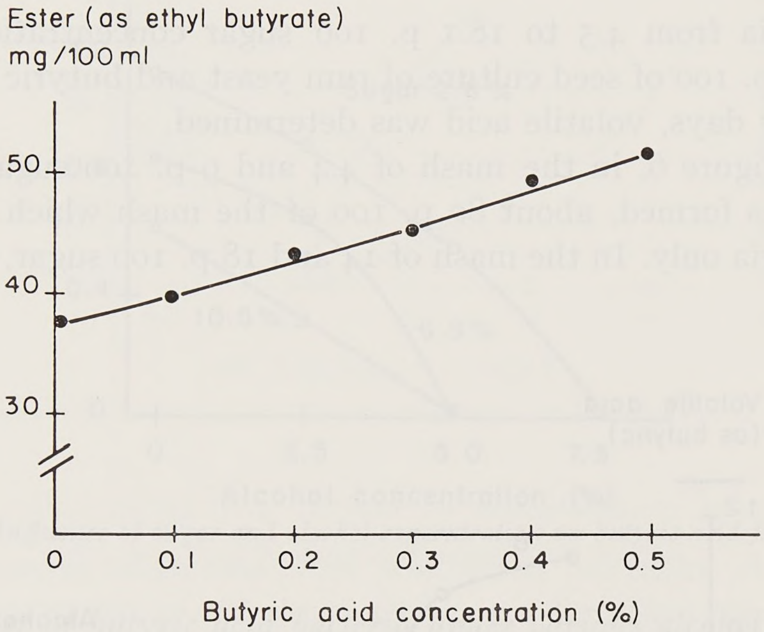



FIG. 7. — *Ester formation from pure butyric acid by rum yeast*

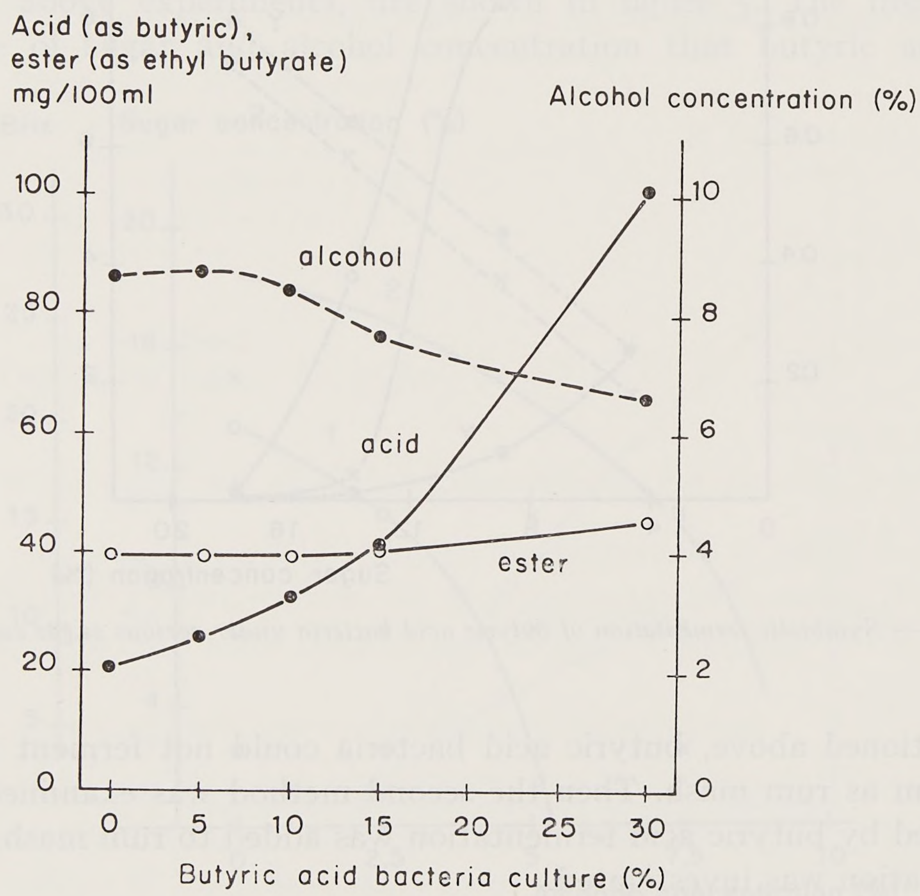



FIG. 8. — *Effect of addition of butyric acid bacteria culture to rum mash*

2. *Effect of addition of butyric acid culture to rum mash.*

Five to 30 p. 100 of high acid mash was added to the rum mash to which rum yeast was simultaneously inoculated. After being fermented for 7 days, 150 ml of mash was distilled to obtain 50 ml of distillate.

As shown in figure 8, addition from 15 to 30 p. 100 of high acid mash was very effective for increasing acid content and enriching rum flavor. But ester was increased just a little as in the above experiment.

### IV. — *Distillation-ratio of acetic, butyric acid, ethyl acetate, ethyl butyrate from aqueous and 10 p. 100 alcohol solution at various* Hp

The constituents of distillate might be varied largely depending on the distilling conditions, even though distilled from the same mash. Especially with volatile acid ester, pH of mash was considered to be very important factor. So, the influence of pH of mash on volatile acid and ester content of distillate was examined.

TABLE 3

*Distillation ratio of acetic acid, butyric acid, ethyl acetate and ethyl butyrate from aqueous and 10 p. 100 alcohol solution at various* pH

| Solution to be distilled | | | | Distilling | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | Concentration (mg/100 ml) | pH | Concentration (mg/100 ml) | Distilling ratio (%) |
| Aqueous solution | Acetic acid | 106.2 | 2.0 | 61.2 | 19.2 |
| | | | 3.5 | 56.4 | 17.7 |
| | | | 5.0 | 27.0 | 8.4 |
| | Butyric acid | 96.8 | 2.0 | 176 | 60.6 |
| | | | 3.5 | 176 | 60.6 |
| | | | 5.0 | 105.6 | 36.3 |
| | Ethyl acetate | 50 | 2.0 | 88 | 58.7 |
| | | | 3.5 | 86.2 | 57.5 |
| | | | 5.0 | 88 | 58.7 |
| | Ethyl butyrate | 50 | 2.0 | 73.1 | 48.7 |
| | | | 3.5 | 71.9 | 47.9 |
| | | | 5.0 | 76.6 | 51.0 |
| 10 p. 100 Alcohol solution | Acetic acid | 106.2 | 2.0 | 48 | 15 |
| | | | 3.5 | 43.2 | 13.5 |
| | | | 5.0 | 18.6 | 5.8 |
| | Butyric acid | 96.8 | 2.0 | 165 | 56.9 |
| | | | 3.5 | 157 | 54.2 |
| | | | 5.0 | 94 | 32.4 |
| | Ethyl acetate | 50 | 2.0 | 117 | 78 |
| | | | 3.5 | 117 | 78 |
| | | | 5.0 | 114 | 76 |
| | Ethyl butyrate | 50 | 2.0 | 111 | 74.2 |
| | | | 3.5 | 107 | 71.1 |
| | | | 5.0 | 107 | 71.1 |

The pH of these solutions were adjusted to 2.0-5.0, to which pure acid and ester were added separately. 150 ml of solution was distilled to obtain 50 ml of distillate. The results are shown in table 3. Volatile acid content was increased as pH of solution became, lower, while ester content was not varied.

### V. — *Ester formation during distillation from 10 p. 100 alcohol solution containing acetic and butyric acid*

In order to know how much ester is formed during distillation from alcohol and acids contained in rum mash, pure acetic and butyric acid was added to 10 p. 100 alcohol solution, which was distilled at various pH. 150 ml of solution was distilled to obtain 50 ml of distillate like previous experiment.

The results are shown in table 4. Ester was formed to a large extent as pH became lower, and as acid content in solution was higher

TABLE 4

*Ester formation during distillation*

| Solution to be distilled | | | Distillate | |
|---|---|---|---|---|
| | Concentration (mg/100 ml) | pH | Ester (mg/100 ml) | Acid (mg/100 ml) |
| Acetic acid | 106.2 | 2.0 | 6.2 | 48 |
| | | 3.5 | 4.4 | 43.2 |
| | | 5.0 | 0.9 | 18.6 |
| | 204.2 | 2.0 | 15.8 | 93 |
| | | 3.5 | 4.4 | 88.8 |
| | | 5.0 | 2.6 | 52.8 |
| | 301.1 | 2.0 | 23.8 | 131.4 |
| | | 3.5 | 5.3 | 131.4 |
| | | 5.0 | 5.3 | 87.6 |
| Butyric acid | 96.8 | 2.0 | 5.8 | 165.4 |
| | | 3.5 | 2.3 | 157.5 |
| | | 5.0 | 1.1 | 94.2 |
| | 201.0 | 2.0 | 17.4 | 287 |
| | | 3.5 | 5.8 | 308 |
| | | 5.0 | 5.8 | 178 |
| | 302.4 | 2.0 | 18.6 | 442 |
| | | 3.5 | 9.3 | 451 |
| | | 5.0 | 8.1 | 278 |

### VI. — *Influence of* pH *of mash on the constituent of distillate*

According to the result shown in tables 3, 4, the constituents of distillate varied largely depending on pH of solution. Then, influence of pH of mash on the constituent of distillate was examined.

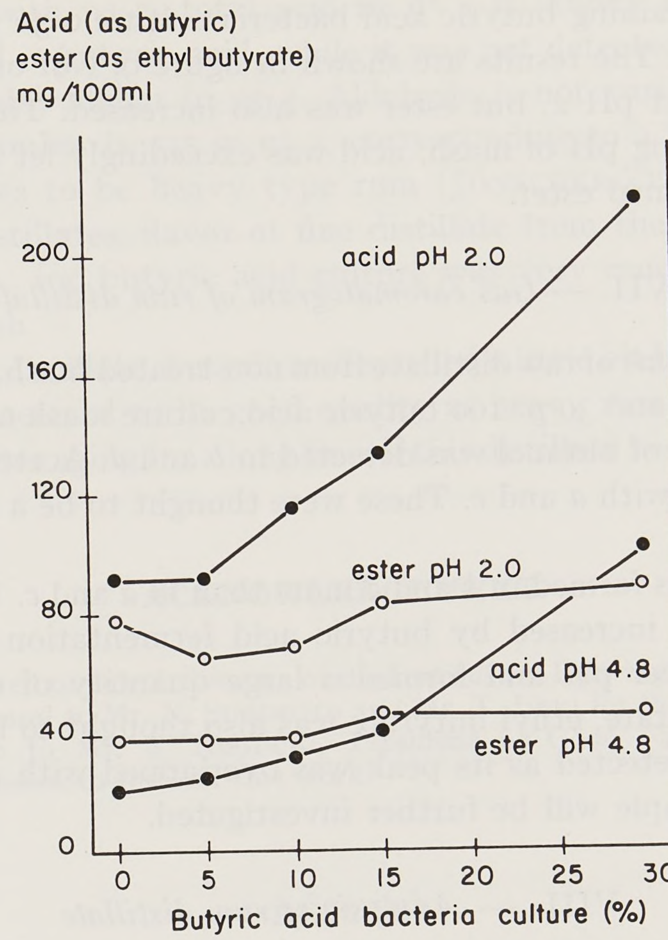



FIG. 9. — *Influence of* pH *of mash on the concentration of distillate*

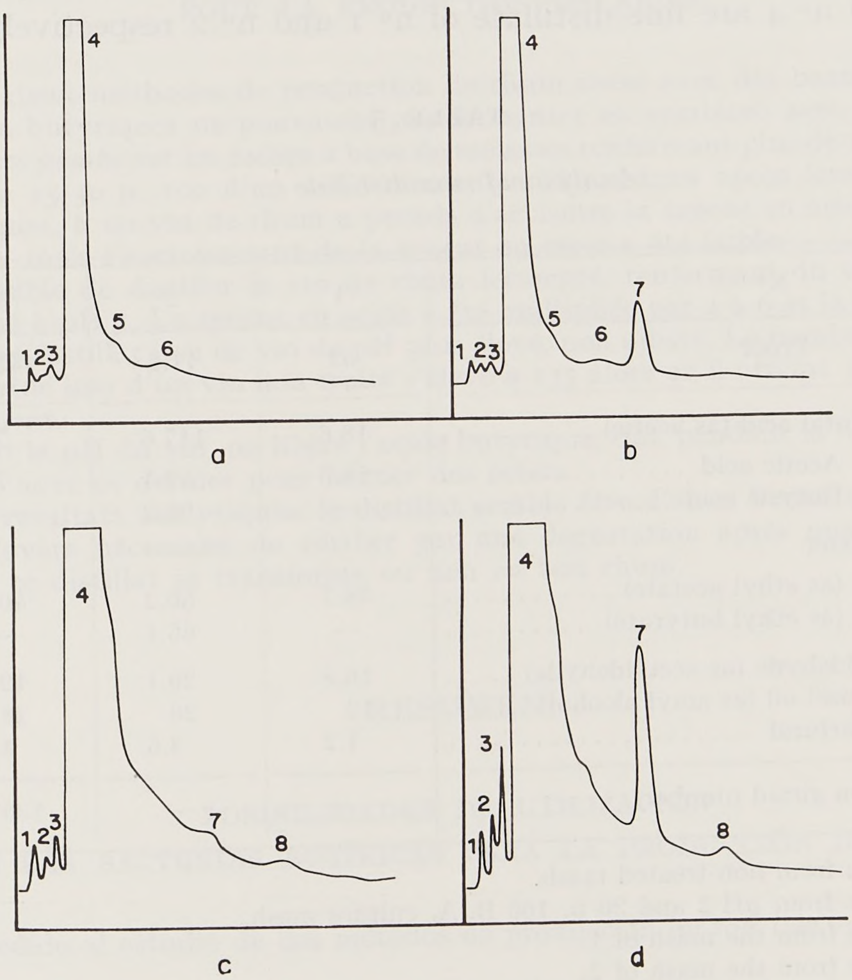



FIG. 10. — *Gas chromatogram of rum distillate*

Rum mash containing butyric acid bacteria culture 0-30 p. 100 were distillated at pH 4.8 and pH 2. The results are shown in figure 9. Not only acid was increased largely by distilled at pH 2, but ester was also increased. This might be explained as follows. By lowering pH of mash, acid was exceedingly let free which was reacted with alcohol and formed ester.

## VII. — *Gas chromatogram of rum distillate*

Gas chromatograms of raw distillate from non-treated mash, raw distillate and fine distillate from pH 2 and 30 p. 100 butyric acid culture mash are shown in figure 10.

A large quantity of butanol was detected in *b* and *d*. Acetone was also increased in *b* and *d* compared with *a* and *c*. These were thought to be a result of butyric acid fermentation.

Ethyl acetate was formed in *b* and *d* more than in *a* and *c*. It might be explained that acetic acid was increased by butyric acid fermentation and largely distilled by distillating at lower pH and formed a large quantity of ester.

Besides ethyl acetate, ethyl butyrate was also thought to be formed in *b* and *d*, but it could not be detected as its peak was overlapped with ethanol. The method of preparation of sample will be further investigated.

## VIII. — *Analysis of rum distillate*

Analysis of rum distillate is shown in table 5. N° 1 is raw distillate from non-treated mash, n° 2 is raw distillate from pH 2 and 30 p. 100 butyric acid culture mash. N° 3 and n° 4 are fine distillate of n° 1 and n° 2 respectively.

TABLE 5

*Analysis of rum distillate*

| N° | | 1 | 2 | 3 | 4 |
|---|---|---|---|---|---|
| Proof | | 52 | 41.2 | 143.8 | 120.2 |
| mg/100 ml not calculated to proof | Total acid (as acetic) | 18.6 | 117.6 | 7.2 | 72 |
| | Acetic acid | 18.6 | 49.4 | 7.2 | 25.9 |
| | Butyric acid | — | 68.2 | — | 46.1 |
| | Ester | | | | |
| | (as ethyl acetate) | 38.7 | 50.2 | 40.5 | 68.6 |
| | (as ethyl butyrate) | — | 66.1 | — | 90.5 |
| | Aldehyde (as acetaldehyde) | 16.8 | 20.1 | 19.5 | 23.8 |
| | Fusel oil (as amyl alcohol) | 12 | 20 | 28 | 61 |
| | Furfural | 1.2 | 3.6 | 1.6 | 5.5 |
| Lusson giraid number | | — | — | 135 | 384 |

1 : Raw distillate from non-treated mash.
2 : Raw distillate from pH 2 and 30 p. 100 B. A. culture mash.
3 : Fine distillate from the mash of 1.
4 : Fine distillate from the mash of 2.

Compared nº 4 with nº 3, total acid in nº 4 is largely increased, and about 50 p. 100 of total acid is butyric acid, while it was not detected in nº 3. Ester, fusel oil and furfural are also higher in nº 4. Aldehyde is not varied.

Lusson Giraid number is 135 in nº 3, corresponding to a light rum, while nº 4 is 384 and it indicates to be heavy type rum (JONSCHER-ZITTAU, 1974).

Tasting those distillates, flavor of fine distillate from the mash which is pH 2 and added with 30 p. 100 butyric acid culture was very much stronger than that from non-treated mash.

With the former distillate, butyric acid smelled a little bit harsh. From analytical results, the distillate seemed to be good quality as heavy rum, but it is necessary to confirm by tasting after aging for a long time if this distillate become good rum or not.

## ACKNOWLEDGEMENT

The author is indebted to Dry S. SUGAMA of the Institute of Brewing for kindly offered strains of butyric acid bacteria and to Mr. N. SUGIMOTO and Mr. T. USUI for their skilled technical assistance. Thanks are due to Mr. S. NOGUCHI, President of Gôdô Shusei and Vice-president Mr. G. HORI, for permission to publish this work.

## RÉSUMÉ

### POSSIBILITÉS D'UTILISATION DE BACTÉRIES BUTYRIQUES POUR LA PRODUCTION DE RHUM

On a étudié deux méthodes de production de rhum corsé avec des bactéries butyriques.

Les bactéries butyriques ne pouvaient pas fermenter en symbiose avec la levure de rhum *Shizosaccharomyces pombe* sur un milieu à base de mélasses renfermant plus de 14 p. 100 de glucose.

L'additon de 15-30 p. 100 d'un vin fortement acide, obtenu après fermentation avec des bactéries butyriques, à un vin de rhum a permis d'accroître la teneur en acide et d'améliorer le parfum du rhum, mais l'accroissemnt de la teneur en ester a été faible.

Il a été possible de distiller le vin de rhum fermenté, renfermant du vin fortement acide, de pH bas, amené à pH 2. La teneur en acide a été multipliée par 4 à 6 et la teneur en ester par 2 par rapport à un distillat issu de vin de pH plus élevé, non ajusté. Le nombre de Lusson Giraid d'un distillat clarifié issu d'un vin non traité s'élève à 135 alors qu'il atteint 384 dans le cas d'un vin avec ajustement.

En abaissant le pH du vin, on libère l'acide butyrique, qui, pendant la distillation avec l'alcool, se combine avec ce dernier pour former des esters.

D'après les résultats analytiques, le distillat semble être d'aussi bonne qualité que le rhum corsé, mais il s'avère nécessaire de vérifier par une dégustation après une longue période de vieillissement si ce distillat se transforme ou non en bon rhum.

## RESUMEN

### POSIBILIDADES DE UTILIZACIÓN DE LAS BACTERÍAS BUTÍRICAS PARA LA PRODUCCIÓN DE RON

Se ha procedido al estudio de dos métodos de producción de ron fuerte, con bacterias butíricas.

Las bacterias butíricas no podían fermentar en simbiosis con la levadura del ron *Shizosac-*

*charomyces pombe* en un medio a base de melazas, cuyo contenido en glucosa es superior a un 14 p. 100.

La adición de un 15 a un 30 p. 100 de vino fuertemente ácido, obtenido tras fermentación con bacterias butíricas, a un vino de ron, ha permitido incrementar el contenido de ácido y mejorar el perfume del ron, pero, en cambio, el incremento del contenido en éster ha sido poco elevado.

Ha sido así posible destilar el vino de ron fermentado, que contiene vino fuertemente ácido, de pH reducido, al cual se ha dado un pH de 2. El contenido en ácido ha sido multiplicado por 4 a 6 y el contenido en éster por 2 en relación con un destilado procedente de vino de pH más elevado, no ajustado. El número de Lusson Giraid de un destilado clarificado procedente de un vino no tratado se eleva a 135, mientras que llega a alcanzar 884, en el caso de un vino con ajuste.

Al reducir el pH del vino se libera el ácido butírico, el cual — durante la destilación del alcohol — entra en combinación con este último para formar ésteres.

Según los resultados analíticos, el destilado parece ser de tan buena calidad como el ron fuerte, pero se manifiesta la necesidad de verificar, por degustación tras un largo periodo de añejamiento, si este destilado se transforma o no en ron de buena calidad.

## RIASSUNTO

### POSSIBILITÀ D'IMPIEGO DI BATTERI BUTIRRICI PER LA PRODUZIONE DEL RUM

Oggetto dello studio sono stati due metodi di produzione del rum generoso con dei batteri butirrici.

I batteri butirrici non potevano fermentare in simbiosi con il lievito del rum *Shizosaccharomyces pombe* su un mezzo a base di melasse che racchiudono più di 14 p. 100 de glucosio.

L'aggiunta di 15-30 p. 100 di un vino fortemente acido, ottenuto dopo fermentazione con dei batteri butirrici, a un vino di rum, ha permesso di aumentare il tenore d'acido e migliorare il profumo del rum mentre l'aumento del tenore di estere è stato debole.

E'stato possibile distillare il vino di run fermentato, rinchiudendo del vino fortemente acido, con pH basso, portato a pH 2. Il tenore in acido è stato moltiplicato per dei valori da 4 a e 6 il tenore in estere per 2 rispetto a un distillato derivato da vino con pH più elevato, non aggiustato. Il numero di Lusson Giraid di un distillato chiarificato proveniente da un vino non trattato si eleva a 135 mentre esso raggiunge 384 nel caso di un vino con aggiustamento.

Abbassando il pH del vino, si libera l'acido butirrico che, durante la distillazione con l'alcool, si combina con quest ultimo per formare degli esteri.

Secondo i risultati analitici, il distillato sembra della stessa buona qualità del rum generoso ma appare necessario degustare dopo un lungo periodo d'invecchiamento per controllare se questo distillato si trasforma o no in un buen rum.

## REFERENCES

ARROYO R., 1942. *Manufacture of rum. Sugar.*, (37), 29.

JONSCHER-ZITTAU, 1974. *Zeitschr. öffentl. Chem.*, **20**, Heft 18.

*Ann. Technol. agric.*, 1975, **24** (3-4), 411-420.

# WHAT IS TO BE FOUND IN LITERATURE ABOUT RUM PRODUCTION THAT IS MORE THAN 300 YEARS OLD ?

H. OLBRICH

*Department of Molasses Technology,*
*Institute for Sugar Industry, Berlin (Germany)*

## SUMMARY

The manufacture of rum has been in existence for more than 300 years. It is the oldest technology of industrial molasses utilization. It was towards the end of the 18th century that scientists had access to rum production for the very first time (HIGGINS) and then again after a very long pause towards the end of the 19th century (GREIG). Up to the fourth decade of our century, GREIG's work was still regarded as the basic position of the technology to a substantial degree. Including the development up to the present, the scattered literature on rum, its production and nature, has been alphabetically summarized in a list. This list offers itself as a most useful instrument as it refers to the respective location of the literature and wants to contribute towards an aovidance of irrational work, unproductive searching, *i.e.* idle effort and erroneous investments. The ensuing compilation covers about 150 sources, partly subdivided.

Without sugar cane, there is no rum. The oldest technology, to win high class substances from cane molasses, is the manufacture of rum. The industrial production of rum has been in existence for more than 300 years. Rum distilleries have been traced to the West Indies dating back to the first half of the 17th century, *i.e.* to the Lesser Antilles, the area where the Symposium is to be held.

Bryan HIGGINS (1737-1820), an Irishman, was the first natural scientist who, commissioned by the West India Committee, dealt with the problems of rum production in Jamaica on the very spot from 1796-1802. His reports on rum (1799-1803) were considered to be a guide. It was not until a century later that the Englishman Percival H. GREIG, 1893-1895, followed with systematic results on rum manufacture. Before going to Jamaica, GREIG acquainted himself with microbiological procedures, aided by the Danish scholars HANSEN and JÖRGENSEN in Copenhagen. In 1895 however, his interest in publishing any work of his was brought to a close with three papers. GREIG himself had become a rum manufacturer. In 1936, GREIG's work was

still reviewed to a substantial degree in an extensive paper, as the basic position of science regarding rum manufacture. So no abundant material is to be found in literature about rum manufacture until nearly the middle of our century.

In the last decades, numerous circumstances have influenced both production and market development, as well as yielding some scientific papers.

It is an irrefutable fact that a library is cheaper than a laboratory and that inquiries are far less costly than investments in development work which is already being carried out elsewhere. By means of thorough information regarding the basic position of science and technique, irrational brain-work is avoided, fruitless researching and inventing activities are prevented and the squandering of economic power and capital is hindered. With other words : Ascertainment of which results and suggestions have already been published in order to solve a problem, serves the rationalization and increase in the productivity of science and practice. Unproductive searching, idle effort and erroneous investments are thus avoided. For a sequel to the examination of literature work, which is sometimes unjustly underestimated, American atomic research offers an example which should be a warning ; at an expenditure of vast sums of money, problems were supposedly dealt with, for which complete results were already to be partly found in literature.

The ensuing compilation of literature on rum, its production and nature, is an attempt to gather special literature that is scattered and often hard to come by and in referring to the location, to offer the possibility for a rapid consultation of the sources (1).


## RÉSUMÉ

### QUE PEUT-ON TROUVER DANS LA LITTÉRATURE SUR LA PRODUCTION DU RHUM VIEILLE DE PLUS DE 300 ANS ?

Il y a plus de 300 ans que l'on fabrique du rhum. C'est la technologie la plus ancienne pour l'utilisation des mélasses industrielles. C'est vers la fin du XVIII^e^ siècle que les scientifiques ont accédé pour la première fois à la production du rhum (HIGGINS), puis, après une très longue interruption, à nouveau vers la fin du XIX^e^ (GREIG). Jusqu'à la quatrième décade de notre siècle, l'œuvre de GREIG a été considérée dans une large mesure comme le fondement de la technologie. La littérature éparse concernant le rhum, sa reproduction et sa nature, y compris celle traitant de l'évolution jusqu'à l'heure actuelle, a été classée par ordre alphabétique sous la forme d'une liste. Cette liste prétend être un instrument très utile puisqu'elle indique les références de la littérature et entend contribuer à éviter un travail irrationnel, une recherche stérile, c'est-à-dire des efforts vains et des investissements inadéquats. L'étude qui suit englobe 150 sources partiellement subdivisées.



## RESUMEN

### QUÉ SE PUEDE ENCONTRAR EN LA LITERATURA ACERCA DE LA PRODUCCIÓN DE RON DE MÁS DE 300 AÑOS DE EDAD ?

Hace ya más de 300 años que se produce ron. Se trata de la technología más antigua que se conoce para el aprovechamiento y transformación de melazas industriales. Hacia fines del siglo


(1) The author would greatly appreciate it, if additional literature references were sent to the following address : Institute for Sugar Industry, Department of Molasses Technology, Professor Dr Hubert OLBRICH 32, Amrumer Str., D-1000, Berlin 65 (Germany).

XVIII, los científicos han conseguido, por vez primera, producir ron (HIGGINS) y acto seguido, tras una larga interrupción, de nuevo hacia fines del siglo XIX (GREIG). Hasta el cuarto decenio de nuestro siglo, la obra de Greig ha sido considerada en cierto modo como el fundamento de la tecnología en la materia. La literatura dispersa relativa al ron, su producción y su propia naturaleza, e inclusive aquella que trata de la evolución hasta la época actual, ha sido clasificada por orden alfabético, en forma de una lista. Esta lista pretende ser un instrumento sumamente útil, ya que en la misma se indican las referencias bibliográficas y tiene el propósito de contribuir a evitar la ejecución de un trabajo irracional y una investigación estéril, es decir, vanos esfuerzos e inversiones inadecuadas. El estudio que sigue engloba 150 fuentes de origen, parcialmente subdivididas.


## RIASSUNTO

### COSA SI PUO'TROVARE NELLA LETTERATURA SULLA PRODUZIONE DEL RUM CHE RISALE A PIU' DI 300 ANNI FA'?

E' da più di 300 anni che si fabbrica del rum. Si tratta della più vecchia tecnologia per l'impiego delle melasse industriali. E' verso la fine del 18° secolo che i chimici hanno prodotto per la prima volta del rum (HIGGINS). Dopo una lungissima interruzione, questa produzione è stata ripresa verso la fine del 19° (GREIG). Fino alla quarta decade del nostro secolo, l'opera di Greig è stata considerata largamente come il fondamento della tecnologia. La letteratura concernente il rum, la sua produzione e la sua natura, e la letteratura che tratta dell'evoluzione di questo prodotto fino ad oggi, è stata pazientemente classificata per ordine alfabetico sotto forma di lista. Questa lista vuole essere uno strumento utile giacchè permette di avere le informazioni necessarie sulle diverse letterature evitando cosi un lavoro irrazionale o una ricerca sterile, che si traducono invariabilmente in sforzi vani e in investimenti infruttuosi. Lo studio che segue raggruppa 150 fonti parzialmente suddivise.


## REFERENCES

### *Abbreviations of libraries*

*Dt. Pat. A.* : Deutsches Patentamt, D-8000 München 2, Zweibrückenstrasse 12.

*IfGB* : Institut für Gärungsgewerbe und Biotechnologie, D-1000 Berlin 65, Seestrasse 13;
IfGB-(ATL) : « Abteilung Trinkbranntweine und Liköre » (department-library);
IfGB-(GGB) : « Gesellschaft für die Geschichte und Bibliographie des Brauwesens e.V. » (additional library).

*IZI* : Institut für Zuckerindustrie, D-1000 Berlin 65, Amrumer Str. 32.

*further* : NF (Neue Folge) = new series.


*quoted in*

ANDRES M. « Notes sur l'évolution des installations de production des rhums. » Industries alimentaires et agricoles. Juillet-août (1970), p. 901-906. — *CEDAL, 1971*

ANONYMOUS. « Die Fabrikation des Rums in Indien », Hermbstädts, Bulletin 15 (1813), n° 3, p. 268-273. — *IZI : 9-193*

ANONYMOUS. « Distillation des mélasses pour la fabrication des tafias et des rhums », Sucrerie Indigène 6, (1871/72) p. 486-491. — *IZI : 1F1*

ANONYMOUS. « Rum production in Madeira ». Facts about Sugar 14 (1922), p. 401. — *IZI : 1USA18*

ANONYMOUS. « Die Fabrikation des Jamika-Rums und des Batavia-Arraks (Ein Überblick über die wichtigsten Originalarbeiten, besonders englischer und holländischer Forscher) »; Deutsche Destillateur-Zeitung 57 (1936), n° 29, p. 114, n° 30, p. 123-124, n° 35, p. 145-146, n° 38, p. 159, n° 43/44, p. 182-183, n° 50, p. 205-206 (with 27 literature references).

ANONYMOUS. « The rum industry's rapid growth », Facts about Sugar 36 (1941), n° 10, p. 50-51. — *IZI : 1USA18*

ANONYMOUS. « Aussichten auf die Rumherstellung aus Zuckerrohr in Spanien », Prager Zuckermarkt p. 31, supplement to Z. Zuckind. CSR 66 (3) (1942/43). — *IZI : 1CS1*

ANONYMOUS. « Funny Coincidence Department » (about Bacardi) Sugar y Azucar 48 (1953), n° 6, p. 54. *IZI : 1USA18*

ANONYMOUS. « Das Rechnen mit Proofgallonen und Proofgraden », Alkohol-Industrie 70 (1957), n° 18, p. 423. *IZI : 9-195 ; IfGB*

ANONYMOUS. « Importance of the Rum Industry in Puerto Rico, » Sugar y Azucar 55 (1960), n° 8, p. 34. *IZI : 1USA18*

ANONYMOUS. « Graphic History of the Puerto Rican Sugar Industry », Sugar y Azucar 55 (1960), n° 12, p. 60/61. *IZI : 1USA18*

ANONYMOUS. Sugar Cane in Puerto Rico's Economy (Table IV. Rum) p. 109; Sugar y Azucar 60 (1965), n° 4, p. 102-106, 109. *IZI : 1USA18*

ANONYMOUS. « Die Historie vom Rum », Pott-Kompass 1967, n° 3 and 4 ; 1968, n° 2 and 3 (conglomeration). IZI : *9-175*

ANONYMOUS. Berichte vom Rum-Markt. Kompass 1967, 1968 (conglomeration) *IZI : 9-174*

ANONYMOUS. Le rhum. Le Guide de l'Épicier, Avril 1968, p. 9-19. *quoted in CEDAL 1971*

ARROYO R., MANZANO M. « Jamaica Typ Rum in Puerto Rico », University of Puerto Rico, Agr. Expt. Station Report for 1937-38, p. 26-27 ; rev. : Facts about Sugar 35 (1940), n° 4, p. 38. *IZI : 1USA18*

ARROYO R., MARRERO F., HARAVIDEZ L. « Rum Types and the creation of new rum types from cane juice. » Report University of Puerto Rico Agricultural Experiment Station, 1939, p. 43-44, rev. : Facts about Sugar 35 (1940), n° 11, p. 37. *IZI : 1USA18*

ARROYO R. « The Aroma of Rum : The influence of pre-treating the raw material », Revista agricultura industria commercio ; Puerto Rico 32 (1940), n° 2, p. 284-286 ; rev. : Facts about Sugar 35 (1940), n° 11, p. 37. *IZI : 1USA18*

ARROYO R. « The manufacture of rum », Sugar 36 (1941), n° 12, p. 26-27, 34. *IZI : 1USA18*

ARROYO R. « The Aroma of Rum », Revista agriculture Industria Commercio Puerto Rico 32 (1940), p. 416-417 ; « The Aroma of Rum : VI. Influence of the Destillation » a.a.O., p. 593-594 ; rev. : Sugar 36 (1941), n° 3, p. 35. *IZI : 1USA18*

ARROYO R. « The manufacture of rum » Sugar 1941-1942. *IZI : 1USA18*
I. « Selection of yeast and raw materials... Treatment of the raw materials », 36 (1941), n° 12, p. 26-27, 34.
II. « Mashing and fermentation methods... Aftertreatment of the fermented mash », 37 (1942), n° 1, p. 29-32. *IZI : 1USA18*
III. Destillation of the wort... Batch vs. continous stiels... Rum manufacture a selective process », 37 (1942), n° 5, p. 26-29, 33. *IZI : 1USA18*

ARROYO R. « The manufacture of rum », Sugar 1941-1942. IV. and V. « Curing and naturing the product... Dilution of the destillate, removal of odor, aging methods », 37 (1942), n° 6, p. 29-31 ; n° 7, p. 29-31. *IZI : 1USA18*

ARROYO R. « Dilution Problem in Rum Manufacture », Sugar 38 (1943), n° 7, p. 25, 26. *IZI : 1USA18*

ARROYO R. « Genuine and spurious Rums », Sugar 38 (1943), n° 8, p. 25, 27. *IZI : 1USA18*

ARROYO R. « Studies on rum », Research Bulletin n° 5, University of Puerto Rico Agricultural Experiment Station, Rio Piedras, P. R., December, 1945 (see Sugar 45 (1950), n° 1, p. 37, quoted only). *IZI : 1USA18*

ARROYO R. « Advanced features in rum fermentation », Int. Sug. Journ. 52 (1950), p. 42-44. *IZI : 1GB10*

Banc d'essai. Le Rhum. Le nouveau guide Gault et Millau, février 1970, p. 23-27. *quoted in CEDAL, 1971*

BARAUD J., MAURICE A. « Die höheren Alkohole und die leichten Ester von Rums und Apfelbranntweinen (Les alcools et esters des eaux-de-vie de canne et de pomme). Industrie Alimentaires et Agricoles 80 (1963) 3-7 ; rev. : Branntweinwirtschaft 103 (1963), 338. *IfGB*

BARDINET. « Bardinet-Négrita, symbole international du rhum français » Bordeaux s. d., 32 p. ill. *quoted in CEDAL, 1971*

BLOME R. « Englisches America, oder kurtze doch deutliche Beschreibung aller derer denigen Länder und Inseln so der Cron Engeland in Westindien jetziger Zeit zuständig und unterthanig sind : dass sie zeithero von den Franzosen und Englischen des verfluchten Trankes erlernet haben, den man Rum, Rumbullion, oder Ribtdevil, Mortteufel nennet, so noch stärker ist als Weinhefen-Brantwein, und von überbliebener Unreinigkeit des Zuckers und Zuckerrohrs abgezogen und zugerichtet wird », 1697.

BOES J. « Über das Vorkommen von Aminen in Arrak und Rum. » Apoth. Ztg. 22 (1907), p. 56. *IZI : 9-238*

| | |
|---|---|
| Bonis A. « Untersuchungen über die Zusammensetzung der Rume von Martinique », Oesterr. Ung. Z. Zuckerind. Landw. NF 39 (1910), p. 600. | *IZI : 1A1 ; 9-178* |
| Brauer K. « Deutscher Rum », Chem. Ztg. 46 (1922), p. 161-163, 185-186 ; Z. Ver. Zucker-ind. 73 (1923), p. 332-333 ; « Deutscher Arrak », Chem. Ztg. 47 (1923), p. 365-367. | *IZI : 1D5 ; 9-178 ; IfGB* |
| Bremer W. Trinkbranntwein und Likör. 1st Edition 1918 ; Leipzig : 2nd Edition. | *IfGB-Gd44* |
| de Corn. « Mode de fabrication du rhum », French Pat. 32956 ; Catalogue 1857, p. 180. | *Dt. Pat. A.* |
| CEDAL (Centre de Documentation de l'Alimentation, Paris). Histoire de la canne à sucre et du rhum. Économie Familiale n° 22, printemps-été 1970, p. 9-10. | *quoted in CEDAL, 1971* |
| CEDAL (Paris). Richesses françaises d'Outre-Mer, la canne à sucre et le rhum, 1971, 16 p. ; see Z. ZuckInd. 23 (1973) 1, p. 39. | *IZI : 1D12 ; IfGB* |
| CEDAL (Paris). « Le Rhum. » Documentation pratique du CEDAL, 1971, 91 p. with numerous illustrations and tables ; see Z. ZuckInd. 23 (1973), p. 39. | *IZI : 1D12 ; IZI : 9-201* |
| Charpentier de Cossigny J. F. Mémoire sur la fabrication des eaux-de-vie de sucre, 1781 (with Supplément, 1782) ; (an early Mauritian imprint). | *Sugar Industry Res. Institute, Réduit/ Mauritius (libary)* |
| Commissariat général du plan d'équipement et de la productivité. Réponse au questionnaire de l'intergroupe alcools-boissons alcooliques, VI[e] plan, avril 1970, 18 p. dactylographiées. | *quoted in CEDAL, 1971* |
| Comité consultatif du rhum. Rapport du groupe d'experts sur les problèmes posés par l'intégration du rhum dans le Marché Commun, C. C. R., juillet 1970, 45 p. ronéotées, annexes. | *quoted in CEDAL, 1971* |
| Comité national interprofessionnel du rhum. Le rhum, définitions françaises ; C. N. I. R., janvier 1965, 64 p. | *quoted in CEDAL, 1971* |
| Cousins H. H. « Process for treating spiritous liquors », Brit. Patent, n° 16741 (1906). | *IZI : 9-240 Dt. Pat. A.* |
| Cousins H. H. « Landwirtschaftliches und Technisches aus der Versuchsstation für Zuckerindustrie in Jamaika », Oesterr. Ung. Z. Zuckerind. Landw., NF 35 (1906), p. 632-634. | *IZI : 1A1 ; IZI : 9-178* |
| Cousins H. H. « Instructions for making highether Rum », Jamaica : Government Printing Office, 1928. | *IZI : 9-242* |
| Davies J. G. « Anwendung von Trockenhefe in Jamaica-Rum-Brennereien », Chem. Abstr. (1952) 9248 ; Proc. Brit. West Indies Sugar Technol. (1948), p. 26-27 ; rev. : Branntweinwirtschaft 75 (1953), p. 77. | *IfGB* |
| Direction des douanes. Statistiques du commerce extérieur des départements d'Outre-Mer ; différents bulletins. | *quoted in CEDAL, 1971* |
| Dormoy Estienne. L'économie sucrière des départements d'Outre-Mer. Institut des Hautes-Études du droit rural et d'Économie Agricole 1970, 250 p. ronéotées. | *quoted in CEDAL, 1971* |
| Eijkman C. « Mikrobiologisches über Arrakfabrikation in Batavia », Zbl. Bakteriol. Parasitenkunde, 1. Abt., 16 (1894), p. 97-103. | *IfGB* |
| Fédération nationale des producteurs de rhum. Le rhum dans le Marché Commun, décembre 1964, 64 p. | *quoted in CEDAL 1971* |
| Fellenberg Th. von. « Über den Jamaikarum und seine höheren Alkohole », Mitt. Lebensmittel-Hyg. I (1910), p. 352-357. | *IfGB* |
| Ficker M., Szus S. « Über Rumgärung », Zent. Bakt. Parasit. 82 (1930), p. 199-214. | *IfGB* |
| Fincke E. « Über die Unterscheidung von Jamaikarum und Kunstrum », Z. Unters. Nahr. Genussm. 25 (1913), p. 589-596. | *IfGB* |
| Gaber A. Die Fabrikation von Rum, Arrak und Cognac. Leipzig : Hartleben, 1898 (1st Edition) ; Die Fabrikation von Rum, Arrak, Kognak. 2nd Edition, Wien/Leipzig, 1923. | *IfGB-Gd116* |
| Greig P. H., see Olbrich H. Geschichte der Melasse, 1970, p. 721-722, 726, 751. | |
| Guillaume J. « Untersuchungen über das Rum-Aroma », Bull. Assoc. Chimistes 58 (1941), p. 163-174 ; Ztschr. Wirtschaftsgr. Zuckerind. 93 (1943), p. 50-52. | *IZI : D* |
| Haeseler G. « Neuere Arbeiten über Rumfabrikation », Branntweinwirtschaft 3 (1949), p. 180-181. | *IfGB ; IZI : 9-196* |
| Harman C. Les Antilles. Collection Life autour du monde. Time-Life, 1969, 157 p. ill. | *quoted in CEDAL, 1971* |

HERMBSTÄDT S. F. « Die Fabrikation des Rums in Indien », Bulletin des Neuesten und Wissenswürdigsten aus der Naturwissenschaft 15 (1813), nº 3, p. 268-273. *IZI : 9-193*

HERZFELD A. « Bericht über die Versuche zur Darstellung Rum-artiger Produkte aus Rübensaft, Melasse und Rohzucker », Zeitschrift des Vereins für die Rübenzucker-Industrie des Deutschen Reiches 27. N. F.; 40 (1890), p. 645-680 ; Oest.-Ung. Z. Zuckerind. Landw. NF 20 (1891), p. 124-128. *IZI : 1A1*

HIGGINS B., see OLBRICH H. « Geschichte der Melasse », 1970, p. 172-173 with foot-note nº 456 ; p. 216, 250, 721, 748, 766.

HOFMANN C. Chemisch-technisches Universal-Receptbuch, 3rd Edition, Vol. I, Berlin ; 1895, F. Stahn. Chapter IV : « Die Fabrikation der Rum-, Arac- und Cognac-Essenzen », p. 371-387. *IfGB-(ATL)*

INSEE. Bulletins de statistiques des départements et territoires d'Outre-Mer. Bulletins trimestriels. *quoted in CEDAL, 197·*

INSTITUT FÜR ZUCKERINDUSTRIE (IZI), Berlin. Compilation of some Rum-Papers from the years 1906, 1908, 1910, 1923, 1942. Contents. *IZI : 9-178*

1) COUSINS H. H. « Landwirtschaftliches und Technisches [insbesondere über Rumfabrikation] aus der Versuchsstation für Zuckerindustrie in Jamaika », Oesterreichisch-Ungarische Zeitschrift für Zuckerindustrie und Landwirtschaft 35 (1906), p. 632-634.

2) SAITO K. « Notiz über die Melasserumgärung auf den Bonininseln », Österreichisch-Ungarische Zeitschrift für Zuckerindustrie und Landwirschaft 37 (1908), p. 918.

3) BONIS A. « Untersuchungen über die Zusammensetzung der Rume von Martinique », Österreichisch-Ungarische Zeitschrift für Zuckerindustrie und Landwirtschaft 39 (1910), p. 600.

4) SIMON A. « Untersuchungen über die Einteilung der Rume von Martinique nach ihrem Verunreinigungskoeffizienten », Österreichisch-Ungarische Zeitschrift für Zuckerindustrie und Landwirtschaft 39 (1910), p. 600-601. *IZI : 178*

5) BRAUER K. « Deutscher Arrak (Chemiker-Zeitung nº 51/52, 1923) », Zeitschrift des Vereins der Deutschen Zucker-Industrie 73 (NF. 60) (1923), p. 332-333.

6) WINKELHAUSEN W. « Verfahren zur Vorbereitung von Zuckerlösungen beliebiger Herkunft zur Herstellung einer Maische für Rum- oder Arrak-destillate », DRP nº 106 654 ; Deutsche Zuckerindustrie 67 (1942), p. 47.

INSTITUT FÜR ZUCKERINDUSTRIE, BERLIN. Compilation of some Papers about Rum and Rum-Fabrication from the years 1949 till 1967 ; Contents : *IZI : 9-196*

1) [H]ae S[eler]. « Neuere Arbeiten über Rum-fabrikation », Branntweinwirtschaft 3 (1949), nº 12, p. 180-181.

2) BAUSCH. « Rum aus Britisch-Westindien », Branntweinwirtschaft 76 (1954), nº 2, p. 27.

3) V[on] S. « Rum aus Jamaika. Wasser aus Schottland », Branntweinwirtschaft 78 (1956), nº 3, p. 51-52.

4) ANONYMOUS. « Bundesrepublik grösster Rum-Mark der Welt », Branntweinwirtschaft 105 (1965), nº 7, p. 174.

5) ALTENHOFEN G. « Die Wettebewerbssituation auf dem deutschen Rum-Markt », Branntweinwirtschaft 105 (1965), nº 15, p. 407.

6) FEDDERS and DUBICK. « Noch einmal : Die Wettbewerbssituation auf dem deutschen Rum-Markt », Branntweinwirtschaft 105 (1965), nº 20, p. 558, 560.

7) RATHKE. « Bundesmonopolverwaltung für Branntwein zur Einfuhr von Rum », Branntweinwirschaft 107 (1967), nº 9, p. 219-220.

JACOBS M. B. The Chemistry and Technology of Food Products. 1944, Vol. II, New York : Interscience Publishers Inc., Chapter : « Rum » (p. 785-792) ; Chapter : « Denatured Rum » (p. 802), see VALAER. *IZI : C-3792*

JAYATUNGE N., FERNANDO QU. « Änderungen in der chemischen Zusammensetzung des Arraks während der Reifung » Euclides (Madrid) 11 (1951), p. 404-406 ; rev. : Chem. Zbl. (1954) II, 5872. *(rev. : IfGB)*

JONSCHER A. « Zur Kenntnis und Beurteilung von Rum, Rumverschnitten und Kunstrum », Z. Öffentl. Chem. 20 (1914), p. 329-336, 345-349. *IZI : 9-230*

KAPPELLER G., SCHULZE R. « Beitrag zur Rumuntersuchung », Pharm. Zentralhalle 51 (1910), p. 165-170. *IZI : 9-230*

KERVÉGANT D. « Rhums et eaux-de-vie de canne », VANNES : Les Éditions du Golfe (Rue Porte-Poterne) 1946, 512 p. *quoted in CEDAL, 1971*

KOHUT. « Kleine Anfrage im Bundestag wegen der Wiederzulassung von Kunstrum und Kunstarrak ». Branntweinwirtschaft 100 (1960) 522. *IfGB*

LA DOCUMENTATION FRANÇAISE. La Martinique, département français 1961, 84 p. *quoted in CEDAL, 1971*

LABAT P. Nieuwe Reizen naar de Franse Eilanden van America. Amsterdam : B. Lakeman, 1725. Part II (« Tweede Deel »), 404 p. *IZI : 4/101/25*

LASSERRE G. La Guadeloupe. Thèse U. F. I. Bordeaux 1961, 2 tomes *quoted in CEDAL, 1971*

LE RUMEUR G. Enchantement des Antilles-Connaissances des îles. Société d'éditions modernes illustrées, 1963, 343 p. *quoted in CEDAL, 1971*

LEBBIN. « Ein neuer Weg zur Beurteilung von Rum und Arrak. » Chem. Ztg. 50 (1926), p. 334. *IfGB*

LIEBER. « Rectificateur adapté à un appareil distillatoire pour la fabrication des rhums », Brit. Pat., French Pat. 41 055 (1858) ; Catalogue 1859, p. 143. *Dt. Pat. A.*

LORCK-SCHIERNING. « Kleines Rum-Compendium », Alkoholindustrie 64 (1951), 183-185, 221-224. *IfGB ; IZI : 9-180*

LUCKOW C. « Was verstehe man unter der « Esterzahl » beim Original-Rum », Mitt. ATL 20 (1930), nº 1, p. 28-29, 31 (1941), nº 2, p. 5. *IfGB-Gd2*

LUCKOW C. « Über die Begutachtung von Rum, Arrak und Kirschwasser mit Hilfe der Ausgiebigkeitsprobe », Brennerei-Ztg. 50 (1933), 86-87. *IfGB*

MAARSE H., NOEVER de BRAUW M. C. ten. « The analysis of volatile components at Jamaica rum », Journal of Food Science 31 (1966), 951-955. *IZI : 9-177*

MALIGNAC G. La consommation moyenne d'alcool pur diminue. Économie et statistique, Bulletin de l'INSEE, nº 22, avril 1971, p. 49-51. *quoted in CEDAL, 1971*

MALLORY G. E., LOVE R. F. « Quantitative determination of caramel in wine, destilled spirits, vinegar, and vanilla extract », Industrial and Engineering Chemistry, Analytical Edition, 17 (1945), p. 631-637. *IZI : B-3067 IZI : 9-237*

MARBEAU P. Le régime des alcools d'industrie et des alcools de bouche en France. Librairie Louis Arnette, 1932, 341 p. *quoted in CEDAL, 1971*

MARILLIER Ch. Distillerie agricole et industrielle-levurerie, sous-produits. Nouvelle Encyclopédie Agricole J. B. Baillière et Fils 1951, 632 p. *quoted in CEDAL, 1971*

MARIOTTI F. Rapport du Commerce d'importation et d'exportation des rhums, présenté par F. Mariotti, 12 p. dactylographiées. *quoted in CEDAL, 1971*

MIOT P. Le régime économique de l'alcool, Berger-Levrault 1961, 267 p. *quoted in CEDAL, 1971*

MAYORAL J. E. « The Operation of the Serrales Rum and alcohol distillery », Facts about Sugar 35 (1940), nº 2, p. 70-74. *IZI : 1USA18*

MICKO K. « Über die Untersuchung des Jamaika-und Kunstrums und zur Kenntnis des typischen Riechstoffes des Jamaika-Rums », Z. Unters. Nahr. Genussm. 8 (1908), p. 433-451. *IfGB*

MICKO K. « Zur Kenntnis der Untersuchung von Branntweinen (Cuba-, Demerara-, Jamaikarum, Arrak, Zwetschgenbranntwein, Kognak, Weingelägerbranntwein) », Z. Unters. Nahr. Genussm. 19 (1910), p. 305-322. *IfGB*

MORIN M. G. « Analysis of Puerto Rican Rums by Gas Chromatography », Sugar y Azucar 60 (1965), nº 4, p. 95.

MOTSCHMANN A. « Zusammensetzung von Rum ». Korrespondenz-ATL 1915. *IfGB-Gd1*

OLBRICH H. Geschichte der Melasse. Berlin 1970, 832 p. ; Chapter : « Rum-Herstellung », p. 709-736. *IZI IfGB*

OLBRICH H. « Grossbritanniens Rum- und Melasse-importe im 19. Jahrhundert und deren Bedeutung für die einheimische Melassebrennerei », Branntweinwirtschaft 106 (1966), p. 144-149. *IfGB IZI : 9-183*

OLBRICH H. « Zur historischen Rum- und Melassebrennerei in Deutschland. Beitrag zur Verwertungsgeschichte der Rohrmelasse vom 17. bis 19. Jahrhundert », Branntweinwirtschaft 105 (1965), p. 197-202. *IfGB ; IZI*

OLBRICH H. « Woher stammt das Wort « Rum »? Branntweinwirtschaft 101 (1961), p. 146. *IfGB ; IZI*

OLBRICH H. « Über die Rum-Gewinnung aus Rohr-und Rübenmelasse », Destillateur-Lehrling 11 (1961), p. 39-47, 49-51 (Supplement to « Branntweinwirtschaft ») ; rev. : Z. Zuckerind. 13 (1963), p. 300. *IfGB ; IZI*

OLBRICH H. « Über die Arrak-Gewinnung aus Rohrmelasse », Destillateur-Lehrling 11 (1961), p. 57-62 (Supplement to Branntweinwirtschaft) ; rev. : Z. Zuckerind. 13 (1963), p. 236. *IfGB ; IZI*

PAIRAULT M. E. A. Le rhum et sa fabrication. Collection des grandes cultures coloniales, Gauthier-Villars 1903, 292 p. fig. *quoted in CEDAL, 1971*

PATURAU J. M. By-products of the Cane Sugar Industry. Elsevier Publishing Co, 1969, 274 p.; Chapter : « Rum », p. 160-169. — *IZI : 9-141*

PISTORIUS L. J. A. Die Fabrication des Rums in zwei Anweisungen einfach, fasslich und vorteilhaft darstellt. Nebst einem vorzüglichen Verfahren, aus fuselhaftem Branntwein Franzbranntwein oder Cognac zu bereiten. Leipzig : Ernst'sche Buchhandlung; without year. 127 p.; Review in : Balling's Zeitschrift des Gewerbewesens 6 (1846/II), p. 678-679. — *IZI*

PORTER G. The Nature and properties of sugar cane. London : Smith, Elder and Co., 1830 (1st Edition). — *IZI : 146/30*

PORTER G. The nature and properties of the Sugar Cane. London : Smith, Elder and Co., 1843 (2nd Edition). — *IZI : 146/43*

POTT H. H., Nfgr. Rumhandelshaus. « Wie Flensburg zur Rumstadt wurde. Eine historische Skizze, herausgegeben anlässlich des Deutschen Schulgeographentages 1964 », Flensburg, 1964, 4 p. — *IZI : 9-194*

POTT H. H. Nfgr. Rumhandelshaus (Flensburg) : Rum : Sonne der glücklichen Inseln. 1969. 128 p. — *IfGB (-ATL); IZI : 9-145*

POTT. Das Buch vom guten Pott. Eine Rum-Fibel. 2nd Edition, Flensburg (without year), 108 p. — *IZI : 9-102*

POTT-KOMPASS (Journal for Employees of « H. H. POTT, Nfgr. Rumhandelshaus Flensburg) 1967, n° 1-5; 1968, n° 1-5; 1969, n° 1-5; 1970, n° 1-5; 1971, n° 1-5; not published anymore. — *IZI*

POUQUET J. Les Antilles Françaises. Collection Que sais-je, Presses Universitaires de France, 1971, 126 p. — *quoted in CEDAL, 1971*

PRAKTIKUS. « Dextrinausflockung im Rum-Verschnitt ». Alkohol-Industrie 64 (1951), n° 18, p. 488. — *IfGB*

RIOLLANO A. « Puerto Rico increases rum exports », Sugar 45 (1950), n° 7, p. 44-46. — *IZI : 9-171*

RIPERT F. « Essai de synthèse sur le rhum français », Union syndicale des producteurs de sucre et de rhum de l'île de la Réunion (336, rue Saint-Honoré; Paris 1er), avril 1959, 84 p. dactylographiées. — *quoted in CEDAL, 1971*

RIPERT F. « Le sucre et le rhum à l'île Bourbon », La Revue Française septembre 1971, p. 34-35. — *quoted in CEDAL, 1971*

ROSE L. « Die Alkohol- und Rumfabrikation in Costa Rica », Z. Spiritusind. 51 (1928), p. 194-195. — *IZI : 9-172; IfGB*

SAITO K. « Notiz über die Melasse-Rumgärung auf den Bonininseln », Zentr. Bact. parasit. ZI (1908), p. 675-677; Oester. -Ung. Z. ZuckInd. Landw. NF 37 (1908), p. 918. — *IZI : 9-178*

SAWYER C. N., ANDERSON E. J. Aecobib treatment of rum wastes. Water and Sewage Works 96 (1949), n° 3, p. 112-114 (see Sugar 45 (1950), n° 1, p. 37).

SCHAD G. F. C. « Des Pater Labats, aus dem Orden der Prediger Mönche, Abhandlung vom Zucker... », Nürnberg : G. N. Raspe, 1785, 400 + 48 p.; (Chapter 26 : « Von dem Brandteweine, der aus den Zuckerrohren verfertigt wird, und dessen Zubereitung », p. 332-338); further : p. 344-345. — *IZI : 4/101/85*

SCHERER A. La Réunion. Notes et études documentaires, la Documentation Française, 1967, n° 33-58, 60 p. — *quoted in CEDAL, 1971*

SEDEIS. « Le rhum et le sucre dans les territoires français d'Outre-Mer », Société d'Études et de Documentation Économiques, Industrielles et Sociales, 1949, 101 p. — *quoted in CEDAL, 1971*

SCHAFFER E. « Geruchsprüfung von Rum », Chem. Ztg. 44 (1923), p. 934.

SELL E. « Üeber Cognak, Rum und Arak ». Arbeiten aus dem Kaiserlichen Gesundheitsamte (*a*) 6 (1890), p. 335-352; (*b*) 7 (1891), p. 210-252; (*c*) Sonderdruck; — *IZI : 9-239*

*a*) « Üeber Cognac, das Material zu seiner Herstellung, seine Bereitung und nachherige Behandlung unter Berücksichtigung der im Handel üblichen Gebäuche, sowie seiner Ersatzmittel und Nachahmungen »;

*b*) « Üeber Rum, das Material zu seiner Herstellung, seine Bereitung und nachherige Behandlung unter Berücksichtigung der im Handel üblichen Gebräuche sowie seiner Ersatzmittel und Nachahmungen »;

*c*) Separate paper (a + b) : Berlin : Springer, 1891.

SIMON A. « Untersuchungen über die Einteilung der Rume von Martinique nach ihrem Verunreinigungskoeffizienten », Oesterr. Ung. Z. Zuckerind. Landw. NF 39 (1910), p. 600-601. — *IZI : 9-178*

SIMMONDS CH. Alcohol. Its production, properties, chemistry and industrial application. London, 1919; « Rum », p. 431-437. — *IfGB-Ea55*

SHANNON R. A practical treatise on brewing, distilling and rectification, Vol. 2 p. 56-63 : Method of fermenting and distilling molasses in Great Britain and — *IZI : 9-218; IfGB (-GGB)*

Ireland. ; p. 44-56 : Preparation of rum in the West-Indies, London : Robert Scholey, 1805.

Stretton G. W. P. « Induced fermentation » in rum production », Int. Sug. Journ. 52 (1950), p. 308-309. *IZI : 9-176*

Steinbrinker H. « Bekenntnisse eines Rumschmugglers », Hamburg, 1924

Strunk H. « Über Rumuntersuchungen », Veröffentlichungen aus dem Gebiete des Militär-Stanitätswesens. Heft 52 : Arbeiten aus den hygienisch-chemischen Untersuchungsstellen. V. Teil, Berlin : A. Hirschwald, 1912, p. 26-36. *IZI : 9-230*

Teulieres A. L'Outre-Mer Français hier, aujourd'hui, demain. Berger-Levrault 1970, 483 p. *quoted in CEDAL, 1971*

Toerres C. S. de ; Aguiar J. L. « Colormetric Analysis of Fusel Oil in Rums using o-Nitrobenzaldehyde as color reagent », Journ. of Agriculture Univ. Puerto Rico 54 (1970), n° 1, p. 96-109. *IZI : 1USA71*

Valaer P. « Rum » (p. 2451-2457) ; « Denaturated alcohol and denaturated rum » (p. 2466-2470) in Chapter 51 : « Alcoholic beverages » (p. 2382-2470), in Jacobs M. B. : The Chemistry and Technology of Food and Food Products. 2nd Edition, Vol. III. New York, London : Interscience Publishers Ltd., 1951. *IZI : 9-241*

Walter E. « Die Grogprobe, ein Hilfsmittel zur Beurteilung von Rum und Arrak », Alkohol-Industrie (1953), n° 7, p. 165. *IfGB*

Winkelhausen W. « Verfahren zur Vorbereitung von Zuckerlösungen beliebiger Herkunft zur Herstellung einer Maische für Rum- oder Arrakdestillate ». Deutsche Zuckerindustrie 67 (1942), p. 47. *IZI*

Winkelhausen W. (Höltinghausen i. Oldenburg) : « Verfahren zur Vorbereitung von Zuckerlösungen beliebiger Herkunft zur Herstellung einer Maische für Rum- oder Arrakdestillate », Pat. Anm. 106654 am 12.9.1939 Protektorat Böhmen u. Mähren ; Dt. Zuckerind. 67 (1942) p. 47 ; DRP 720008 (Kl. 6b, Gr. 1.02) from 13.12.1939. *IZI*

Wollny G. « Vom Rum. Arten, Herstellung und Zusammensetzung », Alkohol-Industrie 72 (1959), n° 19, p. 499-502. With explanatory appendixes : *IZI : 9-195*
1) to foot-note p. 502, middle-column :
Anonymous. « Das Rechnen mit Proofgallonen und Proofgraden », Alkohol-Industrie 70 (1957), n° 18, p. 423 ;
2) with regard to text of p. 502, middle-column :
Walter E. « Die Grogprobe, ein Hilfsmittel zur Beurteilung von Rum und Arrak », Alkohol-Industrie 66 (1953), n° 7, p. 165-166 ;
3) as additional appendix :
— s —. « Rum, das Gold der karibischen Inseln », Alkohol-Industrie 66 (1953), n° 3, p. 78-79.

Wollny G. « Martinique-Rum [aus Zuckerrohrsaft und/oder Rohrmelasse] », Alkohol-Industrie 77 (1964), n° 2, p. 47-49. *IZI : 9-168 ; IfGB*

Wrede F. « Die Rumbrennerei in Übersee und in Deutschland », Z. Spiritusind. 51 (1928), p. 150. *IfGB*

Wüstenfeld H., Luckow C. « Zur Frage der Begutachtung von Auslandsrum und Arrak », Korrespondenz ATL (Abteilung Trinkbranntwein und Likörfabrikation im Institut für Gärungsgewerbe Berlin) 18 (1928), p. 23-25. *IfGB-Gd1*

Wüstenfeld H., Luckow C. « Esterzahl, Ausgiebigkeit und Qualität von Rum und Arraksorten des Handels », Mitt. der ATL 20 (1930), n° 1, p. 2-6. *IfGB-Gd2*

Wüstenfeld H., Haeseler G. Trinkbranntweine und Liköre. 4th Edition, Berlin, Hamburg : P. Parey, 1964, p. 623 ; Chapter : « Rum » p. 69-78. *IfGB*

Zeichenverband Echter Rum e. V. Presse-Information on the occaison of the competition between producers of genuine rum and of German « Rum-Verschnitt », (2nd March 1966). Contents : *IZI : 9-173*
1) « Rum-Prozesse beendet. » Information of 3rd July, 1967.
2) Drawing : « Canne a sucre. Saccharum officinarum. »
3) Zeichenverband Echter Rum e. V. « Die Wettbewerbssituation auf dem deutschen Rum- und Rum-Verschnitt-Markt », Press-Information of 2nd March, 1966.
4) Example for the Composition of Genuine Rum (40 Vol-%) and « Rum-Verschnitt » (40 Vol-%).
5) Zeichenverband Echter Rum e. V. « Die Prozesse um Rum und Rum-Verschnitt », Press-Information of 2nd March, 1966.
6) Zeichenverband Echter Rum e. V. « Die Rum-Produktion bedeutender Herstellungsländer », Press-Information of 2nd March, 1966.
7) Zeichenverband Echter Rum e. V. « Spirituosen-Einfuhr in die Bundesrepublik (einschliesslich West-Berlin und Saarland) », Press-Information of 2nd March, 1966. *IZI : 9-173*

8) Zeichenverband Echter Rum e. V. « Imports to the Federal Republic of Germany (inclusive West-Berlin and Saarland), Press-Information of 2nd March, 1966.

9) Statutes of Zeichenverband Echter Rum e. V. (Press-Information of 2nd March, 1966).

10) Zeichenverband Echter Rum e V. Press-Information of 2nd March, 1966 : Statutes of Trade-Marks.

11) Zeichenverband Echter Rum e. V. Parts of the Record of the Special Meeting of the Members from 28th Dec., 1965, in Düsseldorf.

12) Zeichenverband Echter Rum e. V. « Begriffsbestimmungen für Spirituosen », in the Edition of 10th November, 1956, [so called] official text, extract, Press-Information of 2nd March, 1966.

13) Zeichenverband Echter Rum e. V. Advertising Expenditure for Rum and « Rum-Verschnitt » since 1960, Press-Information of 2nd March, 1966.

14) Zeichenverband Echter Rum e. V. Genuine Rum and « Rum-Verschnitt » are two different spirits. The Manifestation of the late Owner of the Firma Pott, Flensburg. Andreas Lorck Schierning. Press-Information of 2nd March, 1966.

*Ann. Technol. agric.*, 1975, **24** (3-4), 421-436.

# FORMATION DES ALCOOLS SUPÉRIEURS DANS LES RHUMS

A. PARFAIT et C. JOURET *

*Station de Technologie,*
*Centre de Recherches agronomiques des Antilles et de la Guyane,*
*97170 Petit-Bourg (Guadeloupe)*

*Laboratoire de Technologie végétale,*
*Centre de Recherches de Toulouse,*
*Auzeville, 31320 Castanet-Tolosan, B.P. 12*

## RÉSUMÉ

Le rhum est une eau-de-vie obtenue après fermentation de mélasses ou de jus de canne à sucre. La formation des alcools supérieurs obéit aux mêmes règles que celles rencontrées pour les autres boissons fermentées.

Les conditions de la fermentation peuvent expliquer l'importance relative des teneurs de chaque alcool supérieur. Les essais en laboratoire rapportés ici ont été volontairement limités aux divers paramètres de la fermentation facilement transposables au niveau industriel. Il apparaît ainsi que le choix de l'espèce et de la souche de levure demeurent les moyens essentiels pour contrôler la formation des alcools supérieurs.

Des perspectives sont également offertes par l'étude de l'influence de la complémentation azotée du milieu fermentaire sur cette production. Les premiers essais montrent que les quantités d'alcools supérieurs formées peuvent être déterminées dans une certaine limite par la nature de la source d'azote et par les quantités ajoutées. En même temps, le rôle clé que peut jouer l'acide céto-butyrique a été souligné.

Des alcools supérieurs sont formés au cours de la fermentation des mélasses et des jus de canne. Ils constituent une partie des impuretés qui participent à l'arôme des rhums et des eaux-de-vie de canne. La diminution des teneurs en ces composés est actuellement considérée comme un facteur d'amélioration de la qualité organoleptique et nutritionnelle de ces produits. Pour cela, on s'est surtout efforcé d'utiliser jusqu'à maintenant les possibilités offertes par l'aménagement des techniques de distillation. Cependant les eaux-de-vie obtenues dans ces conditions de distillation sont trop neutres, car certains composés très aromatiques (esters lourds par exemple) sont également éliminés en grande partie. Durant ces dernières années, les connais-

sances acquises sur les mécanismes de formation des alcools supérieurs ont considérablement progressé. Toutes n'ont pas débouché sur des applications industrielles du fait de la technologie actuelle de fermentation des mélasses et des jus de canne. Dans cette mise au point, nous rappellerons les données de ce problème et nous examinerons les perspectives qui en découlent pour la technologie des rhums.

## A. — MÉCANISME DE FORMATION DES ALCOOLS SUPÉRIEURS

Ce sont les chimistes qui les premiers se sont intéressés au « fusel oil » des eaux-de-vie. Ils ont constaté que les alcools autres que l'éthanol en constituaient la fraction la plus importante.

En 1906, EHRLICH est frappé par la ressemblance structurale entre les alcools supérieurs et les acides aminés. NEUBAUER et FROMHERZ donnent en 1911 une explication plus complète de la réaction d'EHRLICH. SENTHE-SHANAUGNATHAN en 1958 montra que trois enzymes catalysaient cette transformation : une transaminase, une carboxylase et une alcooldéshydrogénase. Un peu plus tard, plusieurs auteurs, dont GUYMON (1960), démontrèrent que les acides cétoniques étaient des intermédiaires communs de la synthèse des alcools supérieurs et de celle des acides aminés ; ils dérivaient donc, pour une part, du métabolisme des sucres. WEBB et INGRAHAM (1963) ont présenté les principales réactions de la biosynthèse des alcools supérieurs qui sont rapportées dans la figure 1. Les travaux d'ÄYRÄPÄÄ (1971) constituent actuellement une contribution très intéressante dans la recherche du contrôle des mécanismes de ces voies de formation.

Lors de la dégradation oxydative des lipides, il peut apparaître des aldéhydes qui conduisent ultérieurement à la formation d'alcools supérieurs. Ces derniers sont en quantité très faible dans les rhums et leur biosynthèse ne sera pas envisagée ici. STEVENS (1960) a montré que des alcools supérieurs pouvaient aussi se former lors de la synthèse des terpènes et des stérols. Cette origine métabolique même pour le 3-méthyl-1-butanol reste mineure.

La réaction d'EHRLICH ne concerne pas tous les acides aminés. L'acide céto-glutarique est l'accepteur du groupement aminé dans la réaction biochimique. La transaminase et la carboxylase nécessitent des cofacteurs qui sont respectivement le pyridoxal-phosphate et la thiamine-pyrophosphate. En fait, il y a deux complexes enzymatiques, le premier concerne la transamination, le second le reste de la réaction. Les α-céto-acides déhydrogénases constituent un système de trois enzymes que l'on peut dissocier : une céto-acide décarboxylase (coenzyme : la thiamine-pyrophosphate une lipoyl-réductase-transacylase (contenant de l'acide lipoïque) et une dihydrolipoyl déhydrogénase (contenant flavine-adénine-dinucléotide et nicotinamide-adénine-dinucléotide). La part relative de ce mécanisme dans la production totale en alcools supérieurs semble mineure dans tous les cas.

Plusieurs remarques peuvent être faites sur la production des alcools supérieurs à partir des composés issus du métabolisme des sucres. Le 3-méthyl-1-butanol, le 2-méthyl-1-butanol, le *n*-propanol et l'isobutanol constituent l'essentiel des alcools supérieurs formés par ce mécanisme. La formation des alcools supérieurs suit

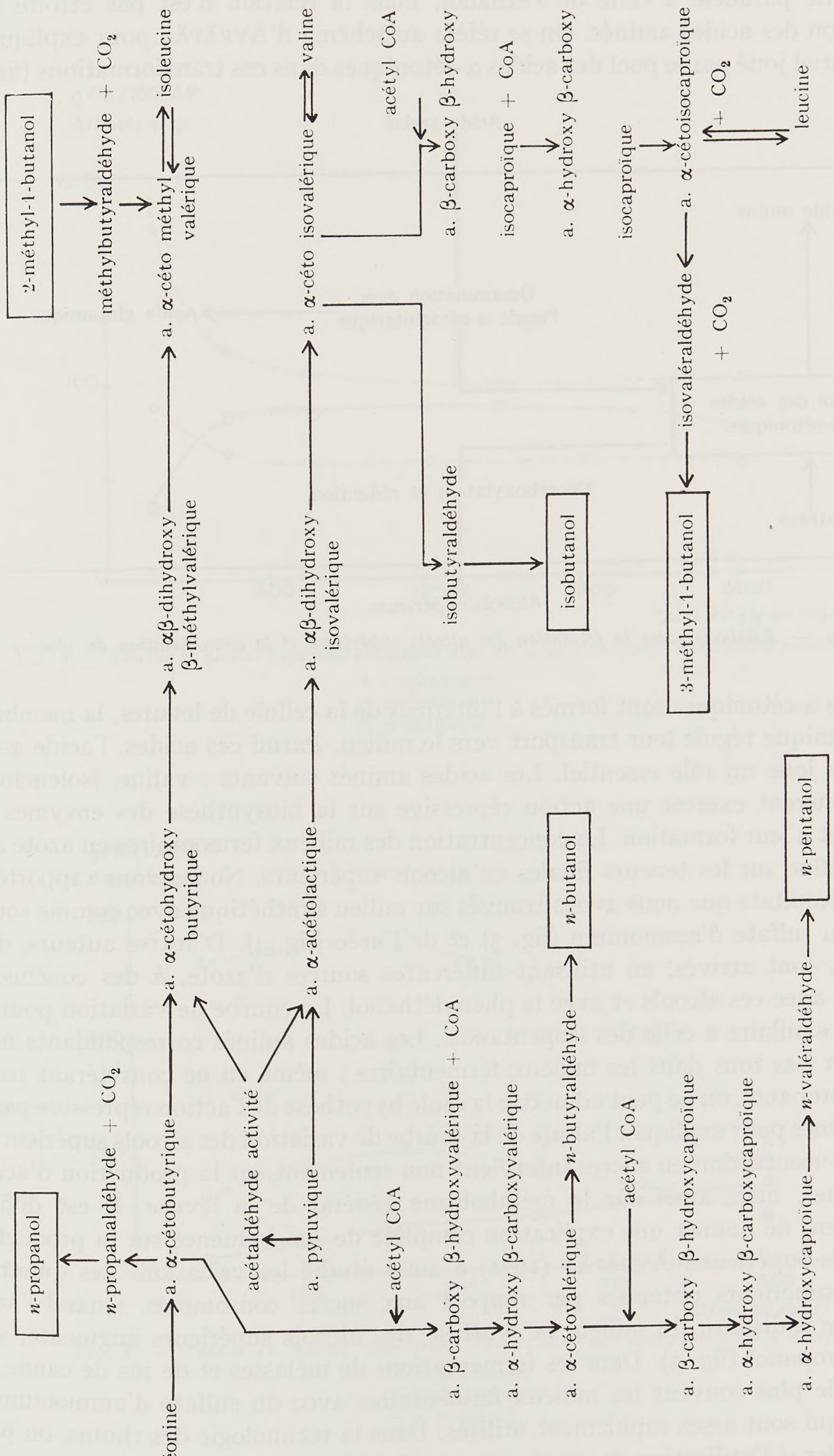



FIG. 1. — *Formation des alcools supérieurs* (d'après WEBB et INGRAHAM, 1963)

une courbe parallèle à celle de l'éthanol, mais la relation n'est pas étroite avec l'utilisation des acides aminés. On se réfère au schéma d'ÄYRÄPÄÄ pour expliquer le rôle essentiel joué par le pool des acides α-cétoniques dans ces transformations (fig. 2).

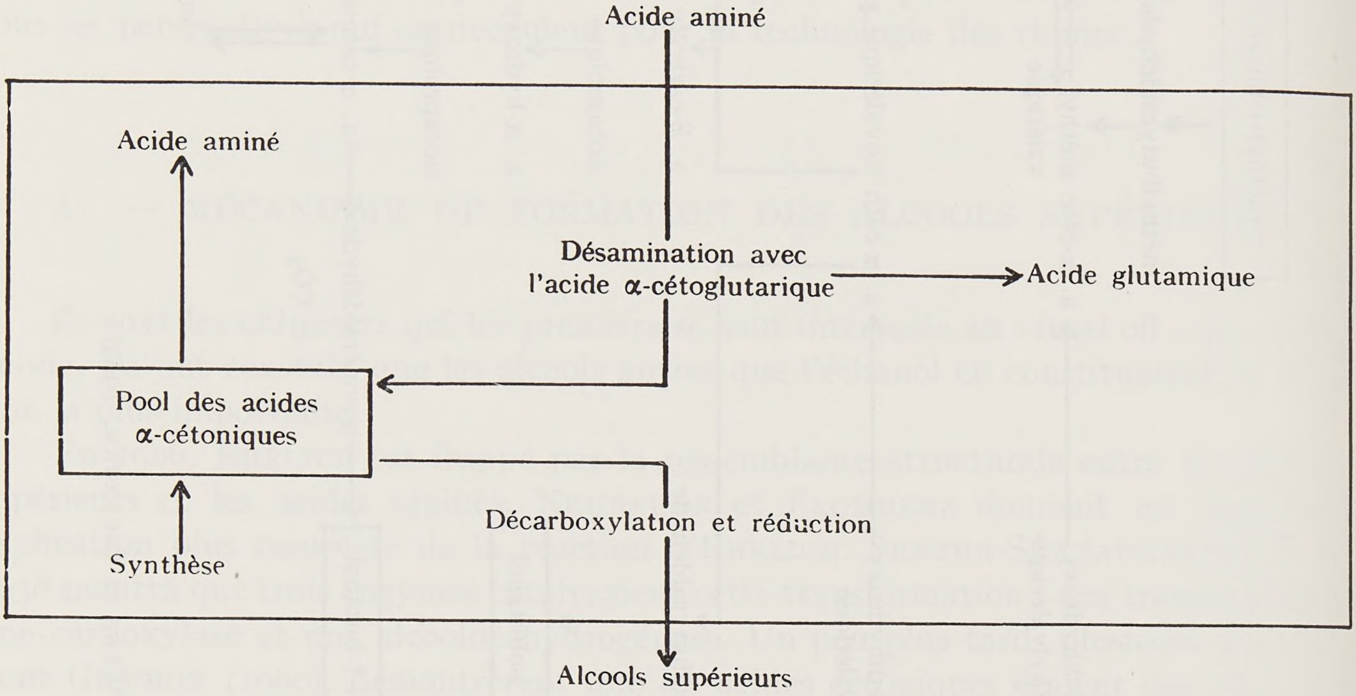



FIG. 2. — *Relations entre la formation des alcools supérieurs et la consommation du glucose*

Les acides α-cétoniques sont formés à l'intérieur de la cellule de levures, la membrane protoplasmique régule leur transport vers le milieu. Parmi ces acides, l'acide α-céto butyrique joue un rôle essentiel. Les acides aminés suivants : valine, isoleucine et leucine peuvent exercer une action répressive sur la biosynthèse des enzymes qui conduisent à leur formation. La concentration des milieux fermentaires en azote assimilable influe sur les teneurs finales en alcools supérieurs. Nous avons rapporté ci-après les résultats que nous avons trouvés sur milieu synthétique avec comme source d'azote du sulfate d'ammonium (fig. 3) et de l'urée (fig. 4). D'autres auteurs, dont ÄYRÄPÄÄ, sont arrivés, en utilisant différentes sources d'azote, à des conclusions analogues avec ces alcools et avec le phényléthanol. La courbe de variation pour cet alcool est similaire à celle des isopentanols. Les acides aminés correspondants ne se retrouvent pas tous dans les milieux fermentaires ; même en ne considérant pas le cas du *n*-propanol, on ne peut admettre la seule hypothèse de l'action répressive par les acides aminés pour expliquer l'allure de la courbe de variation des alcools supérieurs.

La concentration en sucres intervient non seulement sur la production d'acides α-cétoniques, mais aussi sur le métabolisme général de la levure. Il est difficile actuellement de donner une explication complète de son influence sur la production des alcools supérieurs. ÄYRÄPÄÄ (1971) a aussi étudié les variations des quantités d'alcools supérieurs obtenues par rapport aux sucres consommés. Quand l'azote assimilable a disparu du milieu, la synthèse des alcools supérieurs augmente, sauf celle du propanol (fig. 5). Dans les fermentations de mélasses et de jus de canne, on complète le plus souvent les milieux fermentaires avec du sulfate d'ammonium et de l'urée qui sont assez rapidement utilisés. Dans la technologie des rhums, on peut se demander si l'utilisation de substances azotées lentement assimilées (azote retard) ne permettrait pas de contrôler la formation des alcools supérieurs.

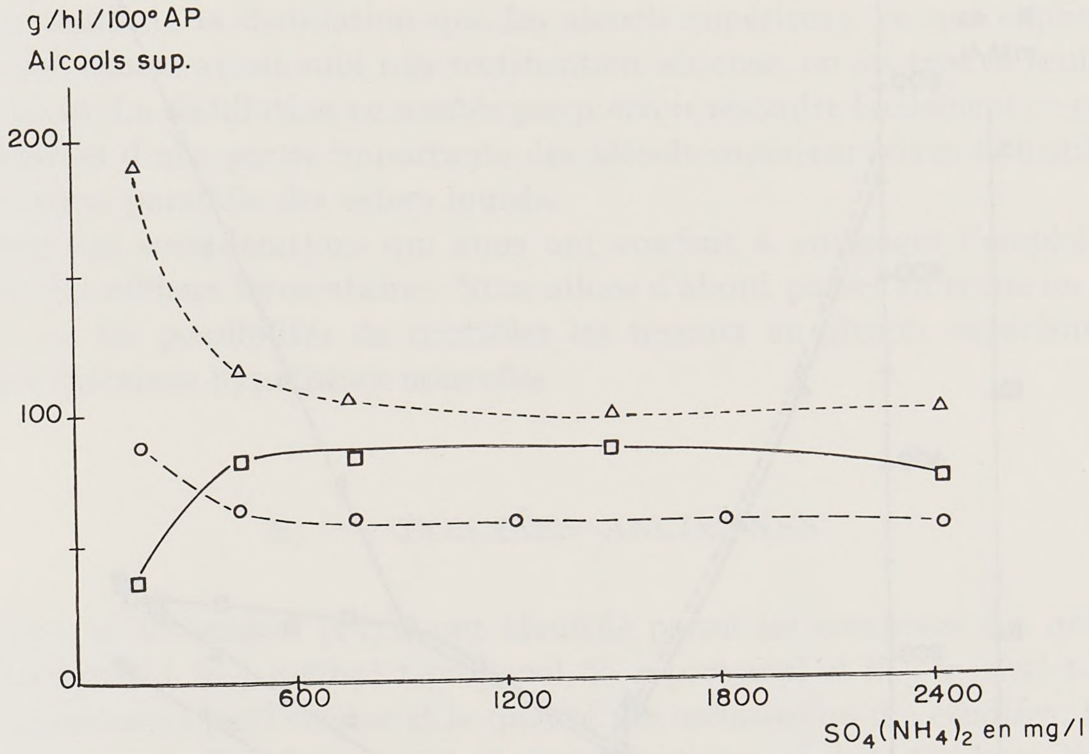



FIG. 3. — *Teneur en alcools supérieurs obtenues avec des doses croissantes de sulfate d'ammonium*

△ isopentanols
○ isobutanol
□ *n*-propanol

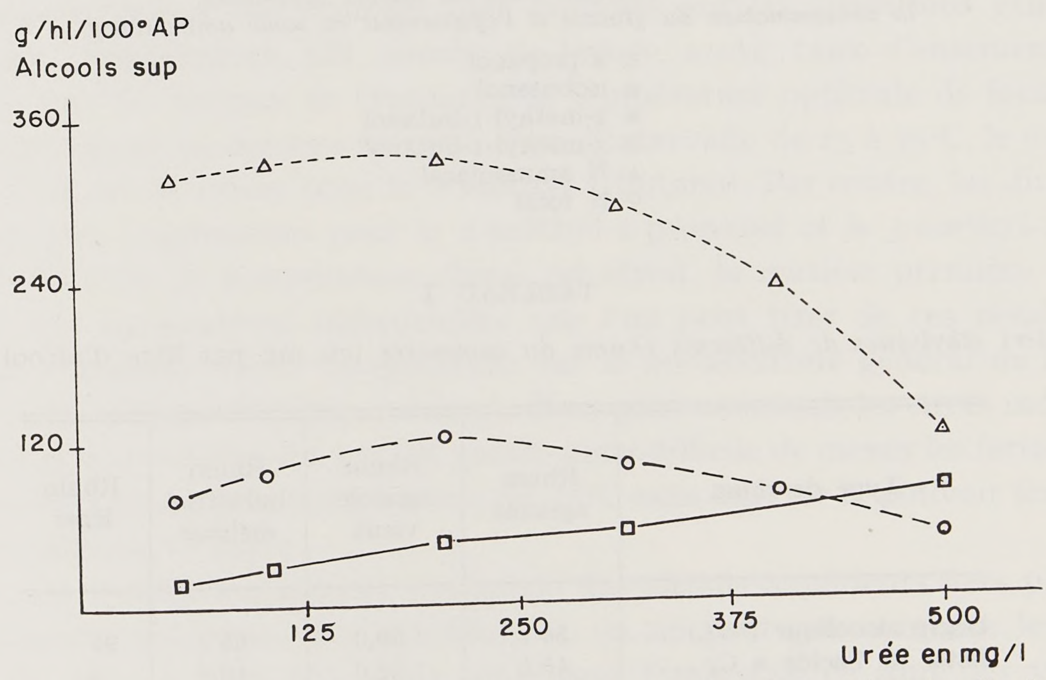



FIG. 4. — *Teneur en alcools supérieurs obtenus avec des doses croissantes d'urée*

△ isopentanols
○ isobutanol
□ *n*-propanol

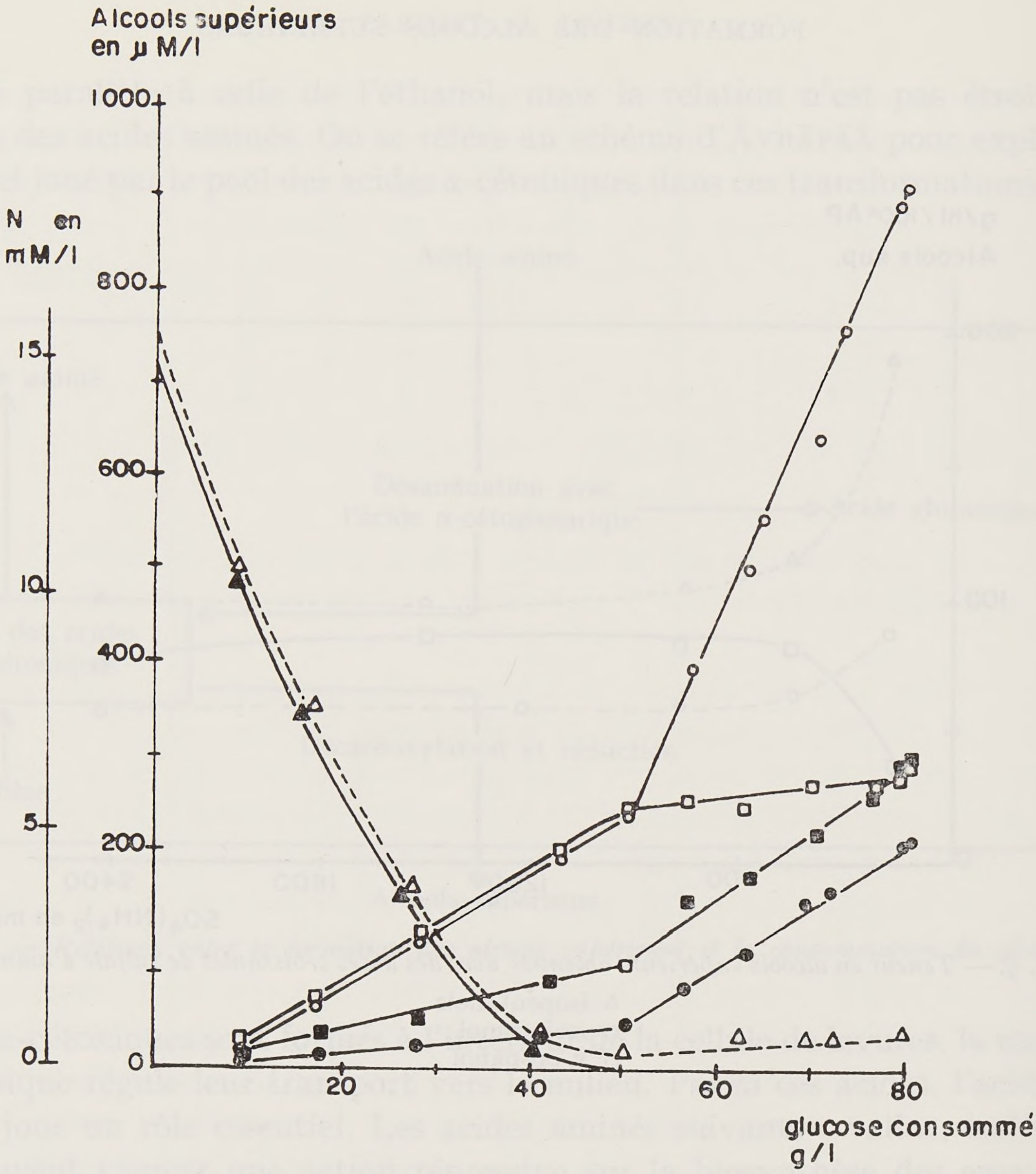



FIG. 5. — *Relation entre les alcools supérieurs,*
*la consommation du glucose et l'épuisement en azote ammoniacal*

□ *n*-propanol
■ isobutanol
● 2-methyl-1-butanol
○ 3-methyl-1-butanol
▲ N ammoniacal
△ N total

TABLEAU I

*Esters éthyliques de différents rhums du commerce* (en mg par litre d'alcool pur)

| Type de rhum | Rhum agricole | Rhum agricole vieux | Rhum industriel mélasse | Rhum léger |
|---|---|---|---|---|
| Degré alcoolique (°GL) ... | 55 | 50,0 | 64 | 94 |
| Ester de l'acide *n* $C_8$ ..... | 16,6 | 22,0 | 10,6 | — |
| Ester de l'acide *n* $C_{10}$ .... | 28,0 | 40,0 | 30,0 | 0,05 |
| Ester de l'acide *n* $C_{12}$ .... | 16,0 | 20,0 | 34,0 | — |
| Ester de l'acide *n* $C_{14}$ .... | 3,6 | 10,0 | 5,6 | — |
| Ester de l'acide *n* $C_{16}$ .... | 17,0 | 18,0 | 20,0 | — |
| TOTAL .......... | 81,2 | 110,0 | 100,2 | 0,05 |

Nous avons dans un travail précédent (PARFAIT *et al.*, 1972) fait l'inventaire des esters éthyliques des acides gras supérieurs dans les rhums (tabl. 1). Ces composés ont un rôle important dans la formation de l'arôme. Ils ont le même comportement au cours de la distillation que les alcools supérieurs, ce qui explique que, dans certains rhums ayant subi une rectification sérieuse, on les trouve seulement à l'état de traces. La distillation ne semble pas pouvoir résoudre facilement ce problème de l'élimination d'une partie importante des alcools supérieurs dans le distillat sans une élimination parallèle des esters lourds.

Ce sont ces considérations qui nous ont conduit à envisager l'emploi d'azote retard dans les milieux fermentaires. Nous allons d'abord passer en revue les données anciennes sur les possibilités de contrôler les teneurs en alcools supérieurs avant d'envisager certaines hypothèses nouvelles.

## B. — DONNÉES ANCIENNES

YOKOTA et FAGERSON (1971) ont identifié parmi les composés des mélasses le 2-méthyl-2-butanol, le 2-méthyl-1-propanol, le *n*-propanol et le 3-méthyl-1-butanol. Nous ne connaissons pas l'origine et la qualité des mélasses qu'il a étudiées. Plusieurs auteurs et en particulier LIEBICH *et al.* (1970) ont trouvé dans le rhum les alcools supérieurs suivants : *n*-propanol, *n*-butanol, 2-butanol, 2-méthyl-1-propanol, *n*-pentanol, 3-méthyl-1-butanol, 2-méthyl-2-butanol, 1-pentanol, 1-hexanol, 2-hexanol, phényléthanol. Au cours de la distillation, et en fonction du mode opératoire, certains alcools supérieurs formés dans le vin ne doivent pas passer dans le distillat. Pour contrôler les teneurs des alcools supérieurs dans les eaux-de-vie de canne et les rhums, on peut penser utiliser des données bien connues sur les conditions générales de fermentation : température, pH, souche de levure, azote, taux d'ensemencement...

Dans le cas des levures de rhumerie, la température optimale de fermentation est située légèrement au-dessous de 30°C. Dans l'intervalle de 25 à 35°C, le *n*-propanol varie peu. Il en est de même pour le 2-méthyl-1-butanol. Par contre, les diminutions sont un peu plus importantes pour le 2-méthyl-1-propanol et le 3-méthyl-1-butanol (fig. 6). L'intervalle de température choisi est étroit, la matière première est ici de la mélasse. Les applications industrielles que l'on peut tirer de ces résultats sont limitées par l'influence de la température sur le métabolisme général de la levure. Nous avons travaillé sur de petits volumes. Si on peut maintenir les cuves industrielles à des températures voisines de 30°C, il paraît assez difficile de mener les fermentations sur des grands volumes à la température de 35°C sans affecter le pouvoir fermentaire des levures (MERRITT, 1966).

Il y a une production globale maximale des alcools supérieurs vers pH = 4,5. Pour des raisons similaires aux précédentes, on ne peut pas conduire les fermentations à des valeurs trop basses de pH. Dans l'industrie ce sont des valeurs de l'ordre de 5 qui sont adoptées.

ARROYO (1945) avait déjà mis en évidence l'intérêt du choix d'une souche donnée pour contrôler les teneurs en alcools supérieurs dans les vins. Nous avons, à partir des milieux fermentaires dans les Antilles françaises, isolé et opéré une sélection des souches de levures, (PARFAIT et SABIN, 1975). Parmi les levures ayant

de bonnes aptitudes rhumières, les *Schizosaccharomyces pombe* sont celles qui produisent le moins d'alcools supérieurs. Elles présentent l'inconvénient d'avoir un taux de croissance faible. Elles ont d'ailleurs été supplantées dans les milieux fermentaires par les *Saccharomyces*. Pour ces dernières levures, on peut faire les observations suivantes : suivant la souche, le taux d'isobutanol varie peu, le taux de *n*-propanol peut être multiplié par 4, celui des isopentanols augmente du simple au double. Certaines souches ont une production globale faible ; dans nos essais de laboratoire, elle est de l'ordre de 120 g/hl d'alcool pur.

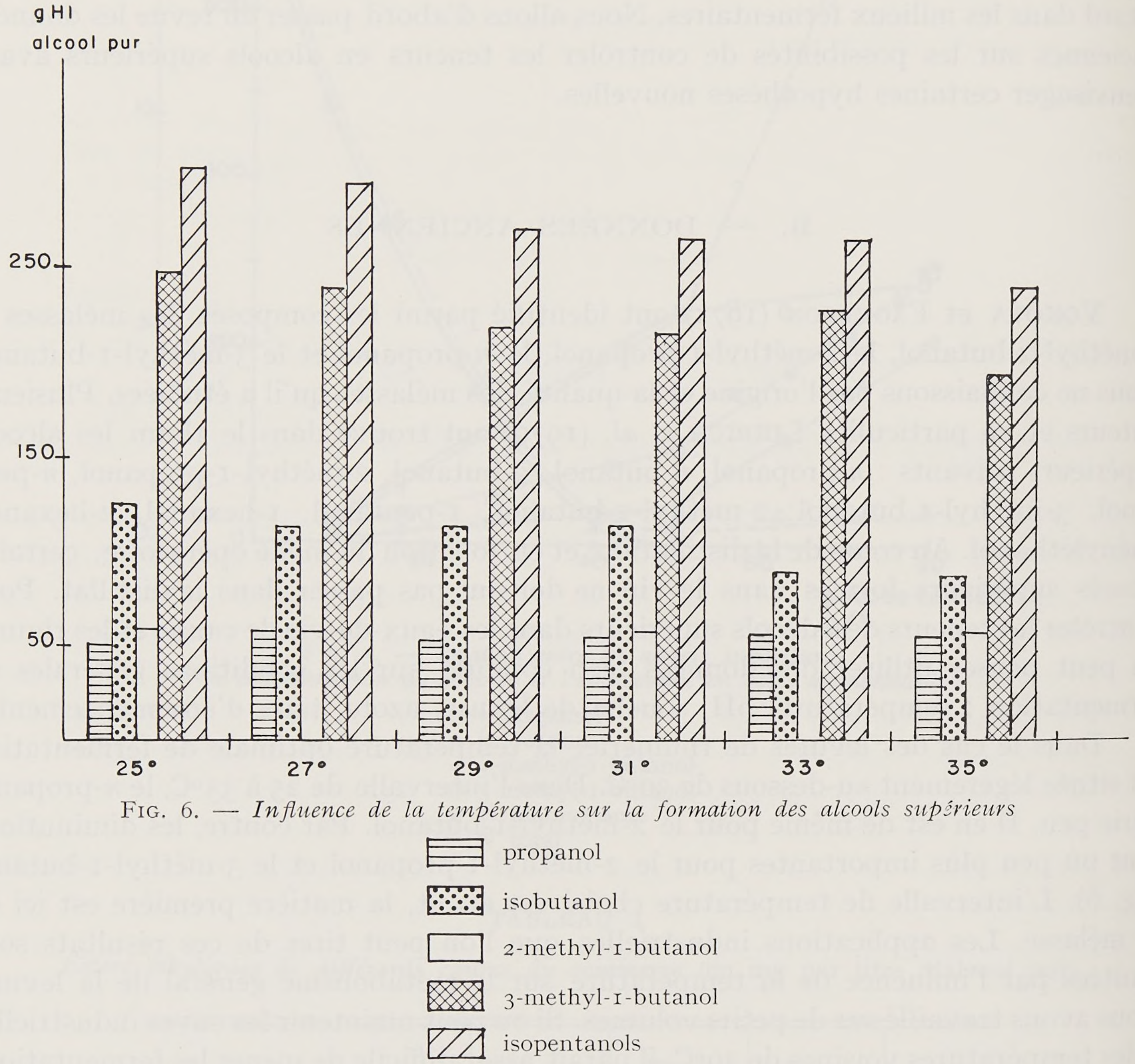



FIG. 6. — *Influence de la température sur la formation des alcools supérieurs*

Les mélasses et les jus de canne doivent être complémentés par une source externe d'azote dans les milieux fermentaires. La figure 7 est relative à des essais avec ou sans complémentation. Le nitroform est constitué de plusieurs polymères de l'urée et de la formaldéhyde plus ou moins solubles. L'urée et le sulfate d'ammonium sont de bons compléments azotés. Ils entraînent une diminution des isopentanols, l'isobutanol varie peu, le *n*-propanol augmente sensiblement. Les résultats avec addition de nitroforme ou sans addition complémentaire d'azote sont pratiquement similaires. Le nitroform, d'après nos observations, est utilisé très lentement par la levure. Il apparaît ici une notion de qualité de la source d'azote de complément ; elle doit

pouvoir être utilisée par la levure dans les premières heures de la fermentation à une vitesse suffisante.

Le taux d'ensemencement conduit à des conclusions variables suivant les auteurs. ENGAN (1972) pense qu'il est sans signification dans la plupart des cas. GRATCHEVA *et al.* (1973) travaillant à des concentrations de 0,2 à 50 g/l trouvent que la quantité maximale d'alcools supérieurs correspond à l'accroissement le plus grand en valeur absolue des levures pour une quantité introduite initiale. Il y a de plus une bonne corrélation avec l'augmentation de la biomasse. A notre avis, la nature et la quantité de la matière première peuvent expliquer ces résultats différents.

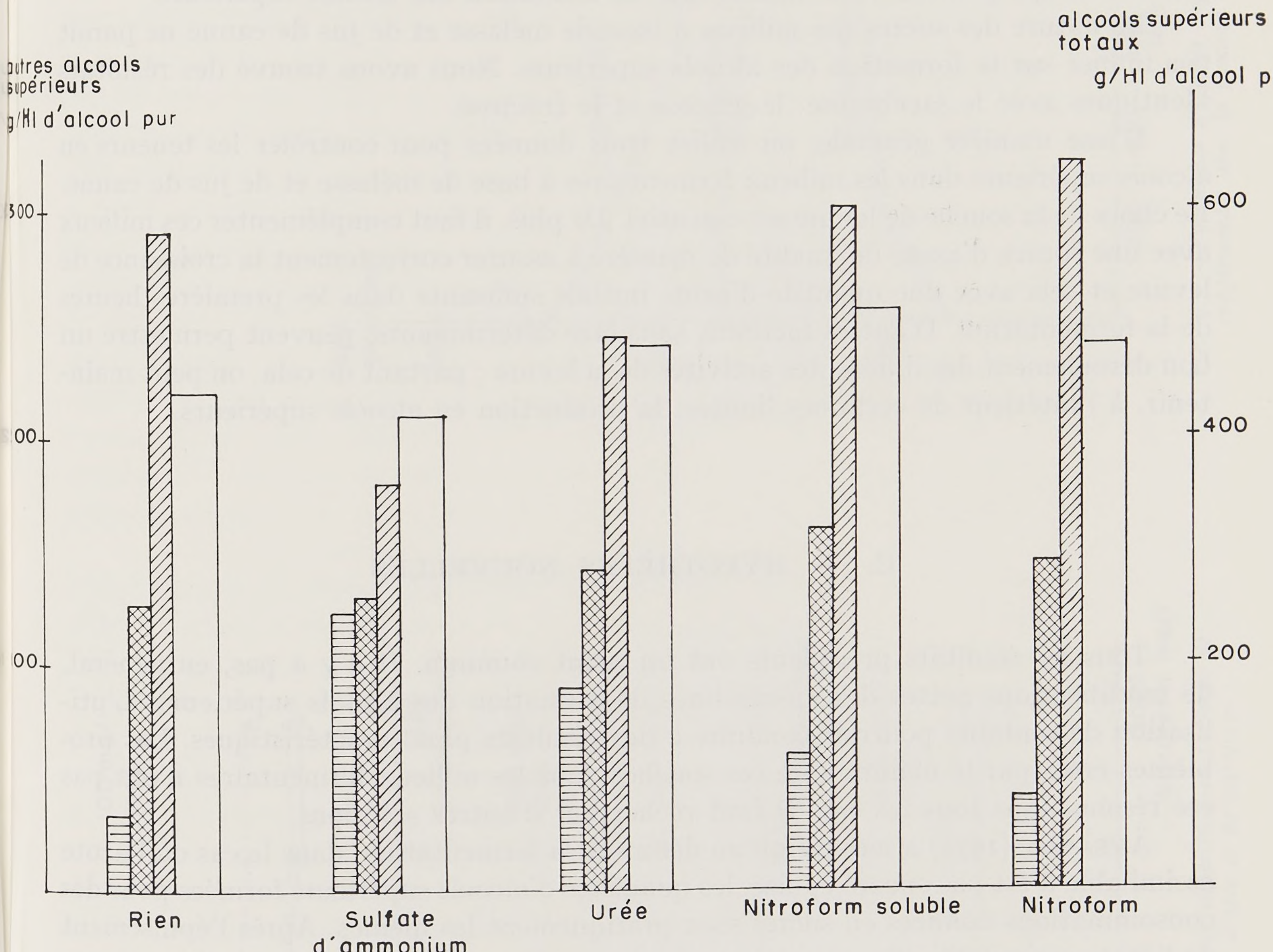



FIG. 7. — *Formation des alcools supérieurs en fonction de la source d'azote*

- *n*-propanol
- isobutanol
- isopentanol
- alcools supérieurs totaux

DUBOIS *et al.* (1968) ont comparé des vins de raisin élaborés suivant des techniques de fermentation continue et discontinue. Dans le premier cas, il y a une diminution des teneurs en alcools supérieurs. ENGAN (1972) arrive sur des bières à des résultats opposés. Comme dans le cas précédent, il est difficile de tirer des conclusions

générales. Il y a certaines relations entre les teneurs des moûts en acides cétoniques, en alcools supérieurs et en acides aminés. Ces relations ne sont qu'un aspect des activités de la levure au cours de la fermentation.

La nécessité de l'établissement rapide des conditions d'anaérobiose et la présence en quantité suffisante des vitamines peuvent s'expliquer aussi par la nature même du phénomène de fermentation. Pour assurer sa croissance en aérobiose, la levure est amenée à accroître la synthèse des acides aminés et on peut prévoir, pour cette raison, qu'il apparaîtra davantage d'alcools supérieurs à partir de ces acides aminés et de leurs intermédiaires, les acides $\alpha$-cétoniques. Enfin beaucoup de facteurs de croissance semblent impliqués dans les mécanismes de formation des alcools supérieurs.

La nature des sucres des milieux à base de mélasse et de jus de canne ne paraît pas influer sur la formation des alcools supérieurs. Nous avons trouvé des résultats identiques avec le saccharose, le glucose et le fructose.

D'une manière générale, on utilise trois données pour contrôler les teneurs en alcools supérieurs dans les milieux fermentaires à base de mélasse et de jus de canne. Le choix de la souche de levure est essentiel. De plus, il faut complémenter ces milieux avec une source d'azote de qualité de manière à assurer correctement la croissance de levure et cela avec une quantité d'azote initiale suffisante dans les premières heures de la fermentation. D'autres facteurs, sans être déterminants, peuvent permettre un bon déroulement des différentes activités de la levure ; partant de cela, on peut maintenir, à l'intérieur de certaines limites, la production en alcools supérieurs.

## C. — HYPOTHÈSES NOUVELLES

Tous les résultats précédents ont un point commun. Il n'y a pas, en général, de modifications nettes des mécanismes de formation des alcools supérieurs. L'utilisation de mutants pourrait conduire à des résultats plus caractéristiques. Les problèmes créés par le maintien de ces souches dans les milieux fermentaires n'ont pas été résolus dans tous les cas. Il faut rechercher d'autres solutions.

Äyräpää (1971) a montré qu'au début de la fermentation, dans le cas où l'azote assimilable n'est pas encore épuisé, les quantités d'alcools supérieurs formées pour des consommations données en sucres sont pratiquement les mêmes. Après l'épuisement de l'azote assimilable (fig. 5) ce n'est plus le cas. Dans les fermentations discontinues sur mélasse et sur jus de canne, il faut compléter les moûts avec une source externe d'azote. Toutes les formes azotées de la matière première ne sont pas également assimilables dans les conditions opératoires. Le sulfate d'ammonium et l'urée qui sont habituellement ajoutés sont assez rapidement utilisés par la levure. On voit là l'intérêt que peut présenter la recherche des conséquences d'une addition supplémentaire d'azote retard dans les milieux fermentaires.

Nous avons mené des essais dans ces conditions sur un milieu simple et sur un milieu à base de mélasse. Les résultats sont portés dans les figures 8 et 9. Sur le milieu simple, pour des concentrations en urée inférieures à 300 mg/l, l'addition d'un azote retard peut entraîner des modifications dans la production de certains alcools supérieurs. Les teneurs en isobutanol varient peu, celles en *n*-propanol

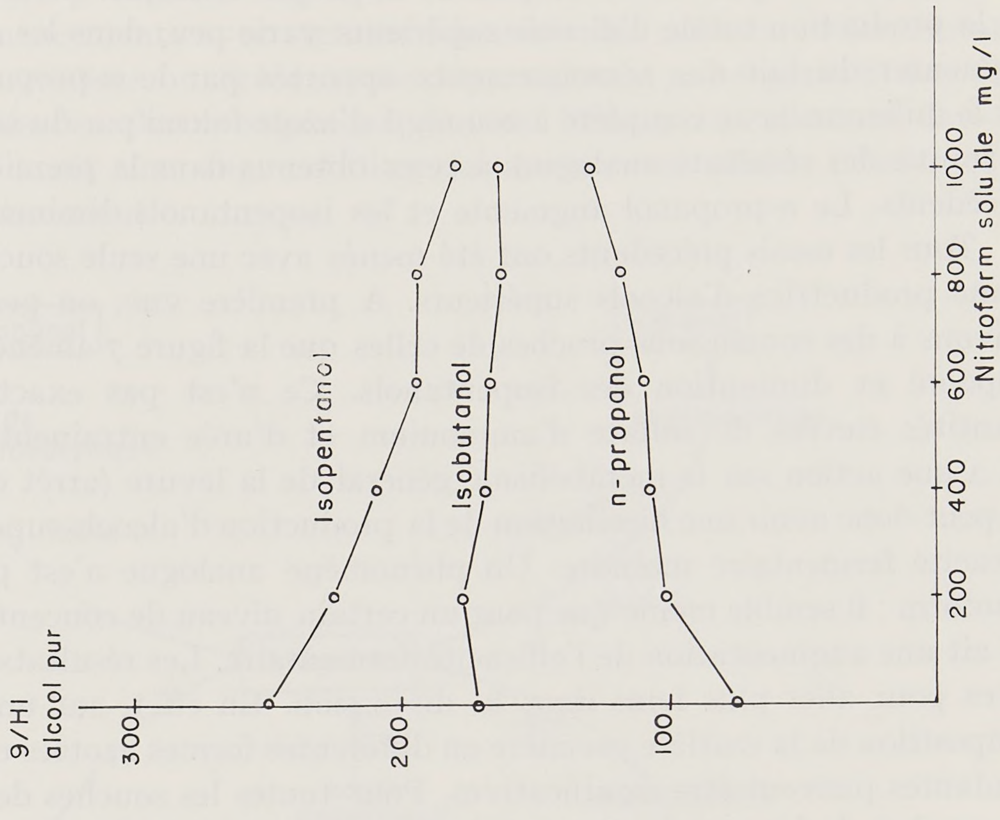



FIG. 9. — *Formation d'alcools supérieurs dans des milieux supplémentés avec la fraction soluble du nitroform*

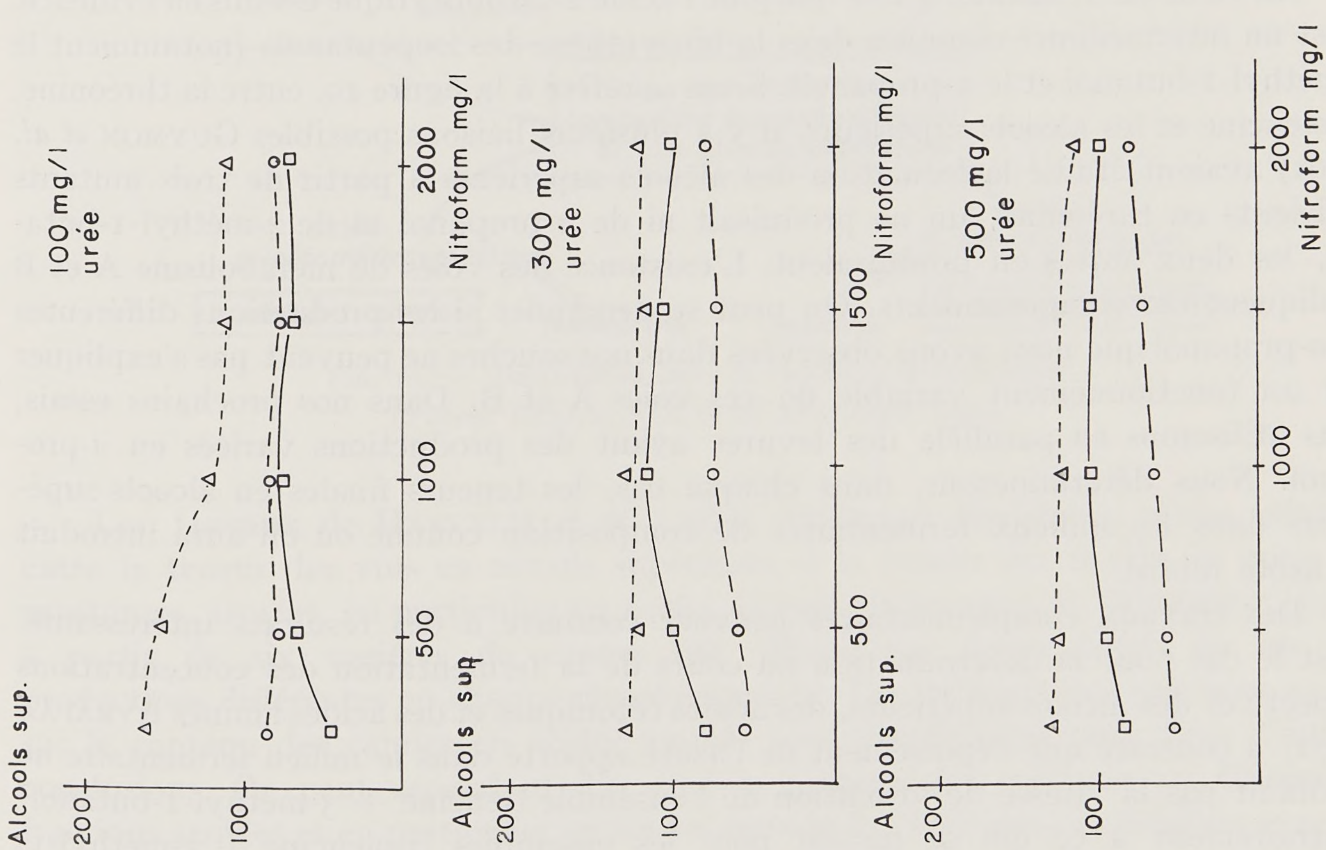



FIG. 8. — *Formation d'alcools supérieurs en présence de diverses concentrations d'urée et de nitroform*

augmentent, celles en isopentanol diminuent. Pour des teneurs supérieures ou égales à 300 mg/l en urée, il semble que l'addition d'un azote retard n'a pas un caractère spécifique en comparaison avec celle de l'urée par exemple. Alors que dans le premier cas la production totale d'alcools supérieurs varie peu, dans les autres cas, elle peut augmenter du fait des accroissements apportés par le *n*-propanol et l'isobutanol. Sur le milieu mélasse complété à 200 mg/l d'azote fourni par du sulfate d'ammonium, on trouve des résultats analogues à ceux obtenus dans la première partie des essais précédents. Le *n*-propanol augmente et les isopentanols diminuent.

Tous les essais précédents ont été menés avec une seule souche de levure qui est bonne productrice d'alcools supérieurs. A première vue, on peut penser que nous arrivons à des conclusions proches de celles que la figure 7 amène : augmentation du propanol et diminution des isopentanols. Ce n'est pas exactement le cas. Des quantités élevées de sulfate d'ammonium et d'urée entraînent une chute du pH qui a une action sur le métabolisme général de la levure (arrêt de la fermentation). On peut donc avoir une diminution de la production d'alcools supérieurs du fait d'une efficacité fermentaire moindre. Un phénomène analogue n'est pas observé pour le nitroform ; il semble même que pour un certain niveau de concentration en nitroform il y ait une augmentation de l'efficacité fermentaire. Les résultats sont trop fragmentaires pour aller plus loins dans la discussion. En effet, sur un milieu mélasse, la composition de la matière première en différentes formes azotées et les teneurs correspondantes peuvent être significatives. Pour toutes les souches de levures, les allures des courbes de formations des alcools supérieurs sont semblables. Les concentrations en alcools supérieurs à partir d'un même mode opératoire ne sont pas les mêmes. Il faut donc mieux préciser les modalités suivant lesquelles les sources d'azotes sont ajoutées.

Au vu de ces résultats, le rôle que joue l'acide α-cétobutyrique est mis en évidence. C'est un intermédiaire commun dans la biosynthèse des isopentanols (notamment le 2-méthyl-1-butanol et le *n*-propanol). Si on se réfère à la figure 10, entre la thréonine, l'isoleucine et les alcools supérieurs, il y a plusieurs liaisons possibles GUYMON *et al.* (1961) avaient étudié la formation des alcools supérieurs à partir de trois mutants déficients en thréonine, un ne produisait ni de *n*-propanol ni de 2-méthyl-1-butanol, les deux autres en produisaient. L'existence des voies de métabolisme A et B expliquent ces comportements. On peut se demander si les productions différentes en *n*-propanol que nous avons observées dans nos souches ne peuvent pas s'expliquer par un fonctionnement variable de ces voies A et B. Dans nos prochains essais, nous utiliserons en parallèle des levures ayant des productions variées en *n*-propanol. Nous déterminerons, dans chaque cas, les teneurs finales en alcools supérieurs dans les milieux fermentaires de composition connue où on aura introduit un azote retard.

Des travaux complémentaires peuvent conduire à des résultats intéressants. C'est le cas pour la détermination au cours de la fermentation des concentrations respectives des alcools supérieurs, des acides cétoniques et des acides aminés ÄYRÄPÄÄ (1971) a constaté que l'épuisement de l'azote apporté dans le milieu fermentaire ne modifiait pas la vitesse de formation de l'ensemble [leucine + 3-méthyl-1-butanol] contrairement à ce qui se passait pour les ensembles [isoleucine + 2-méthyl-1-butanol] et [valine + isobutanol] où il y avait une réduction. Or l'acide α-céto-isovalérique est un précurseur commun dans la synthèse de l'isobutanol et des

alcools isoamyliques. La formation de ces derniers alcools implique aussi la fourniture d'un acétyl CoA. L'énergie nécessaire et les acétyl CoA disponibles pour le déroulement des réactions pourraient expliquer certains faits. ARROYO (1945) avait noté que des ensemencements avec certains *Clostridia* des milieux en fermentation par *Saccharomyces cerevisae* ou *Schizosaccharomyces pombe* provoquaient une diminution des quantités des alcools supérieurs formés. Nous avons constaté dans ces conditions qu'il y avait une augmentation des teneurs en acides volatils et en acétate d'éthyle notamment.

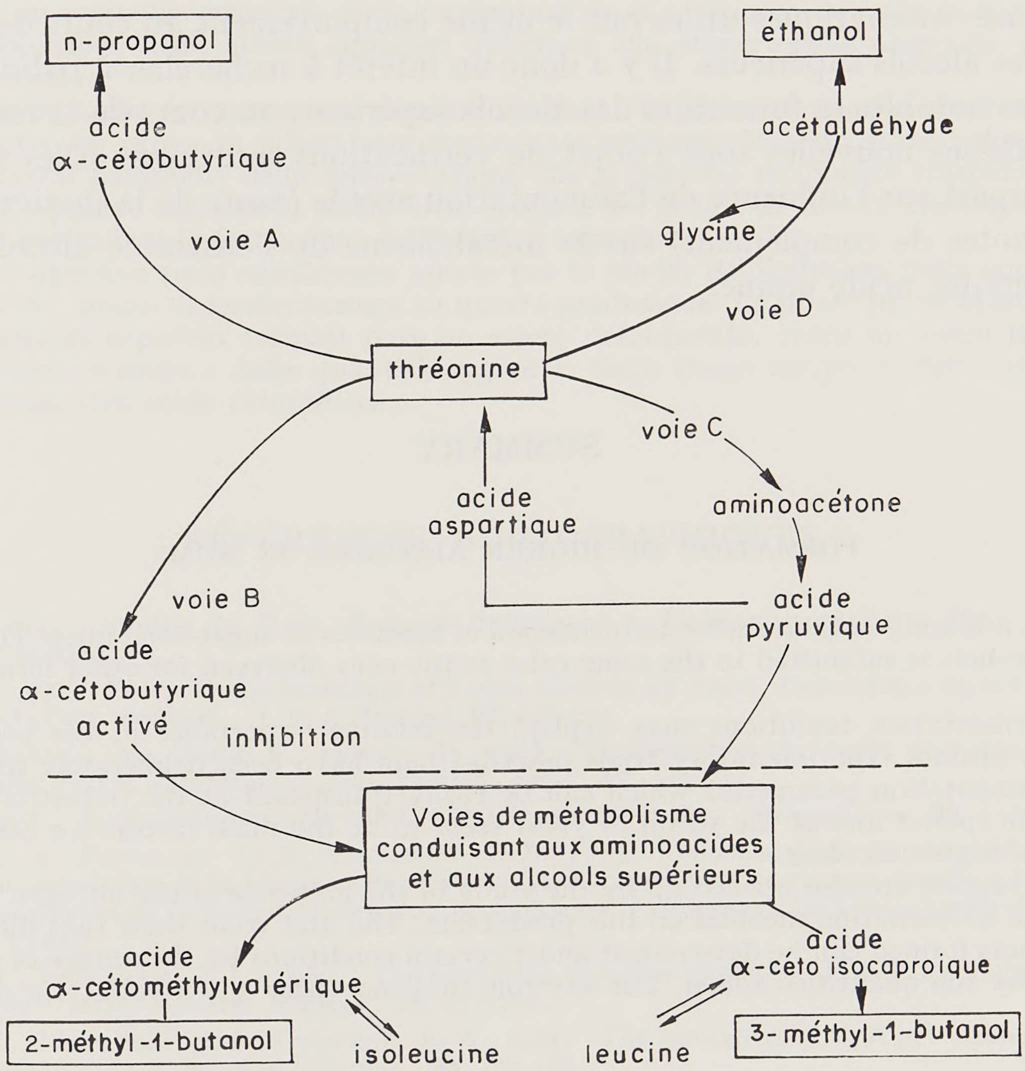



FIG. 10. — *Interrelation entre la thréonine et l'isoleucine*
(d'après RENZIN, SCALES et ANDERSEN, 1973)

Les travaux de HARVALIA *et al.* (1974) indiquent l'existence d'une relation entre la teneur des vins en alcools supérieurs et la teneur des moûts de raisin en substances azotées, en particulier en acides aminés. MONTREAU et DUFRENOT (1974) à partir de six variétés de cannes ont obtenu par fermentation du jus des productions différentes en chaque alcool supérieur. Les informations que nous avons sur le contenu des cannes en acides aminés sont insuffisantes pour tirer d'autres conclusions. On peut cependant dire que le contenu des mélasses en différentes fractions azotées et en particulier en acides aminés doit être aussi en relation avec les quantités finales d'alcools supérieurs. La source d'azote de complément, comme nous avons vu plus haut, peut modifier cette relation qui ne doit pas être simple.

## CONCLUSION

Les mécanismes de formation des alcools supérieurs sont connus. Certaines étapes intermédiaires et les possibilités de régulation des différentes voies sont incomplètement élucidées. Un certain nombre de données relatives à la levure et aux conditions de fermentations ont permis jusqu'à présent de contrôler partiellement les concentrations en alcools supérieurs dans les milieux en fin d'opération. Des composés aromatiques utiles ont le même comportement au cours de la distillation que les alcools supérieurs. Il y a donc un intérêt à rechercher à réduire dans des proportions notables la formation des alcools supérieurs au cours de la fermentation. Des hypothèses nouvelles sont l'objet de vérifications multiples. Elles sont basées pour la plupart sur l'influence de l'alimentation azotée (azote de la matière première, plus les azotes de complément) sur le métabolisme de l'ensemble alcool supérieur, acide cétonique, acide aminé.

## SUMMARY

### FORMATION OF HIGHER ALCOHOLS IN RUMS

Rum is a brandy obtained after fermentation of molasses or sugar-cane juice. The formation of higher alcohols is submitted to the same rules as the ones observed for other fermented beverages.

The fermentation conditions may explain the relative importance of the percentages of each higher alcohol. The laboratory trials describel here have been deliberately limited to the different fermentation parameters which can be easily transposed at the industrial level. The choice of the species and of the strain of yeast seem to be the main factors for controlling the formation of higher alcohols.

New prospects are also opened up by the study of the influence of the nitrogen complement added to the fermentation medium on this production. The first trials show that the amounts of higher alcohols formed can be determined under certain conditions by the nature of the nitrogen source and by the quantities added. The key role that may play the ketobutyrie acid was also stressed.

## RESUMEN

### FORMACION DE LOS ALCOHOLES SUPERIORES EN LOS RONES

El ron es un aguardiente obtenido previa fermentación de melazas o de jugos de caña de azúcar. La formación de alcoholes superiores obedece a las mismas reglas que aquellas que rigen las demás bebidas fermentadas.

Las condiciones de la fermentación pueden explicar la importancia relativa de los contenidos de cada alcohol superior. Los ensayos de laboratorio a que aquí se alude han sido voluntariamente limitados a los diversos parámetros de la fermentación, que pueden ser transpuestos fácilmente a nivel industrial. Puede apreciarse de este modo que la elección de la especie y de la estirpe de levadura constituyen siempre los medios primordiales para controlar la fermentación de alcoholes superiores.

Son también presentadas diversas perspectivas por el estudio de la influencia de la complementación nitrogenada del medio fermentante al tratarse de esta producción. Los primeros

ensayos demuestran que las cantidades de alcoholes superiores formados pueden ser determinados dentro de ciertos límites, por el género de la procedencia de nitrógeno y por las cantidades añadidas. Al mismo tiempo, ha sido puesto de manifiesto el papel clave que puede llegar a desempeñar el ácido cetobutírico.

## RIASSUNTO

FORMAZIONE DEGLI ALCOOLI SUPERIORI NEI RUMS

Il rum e un'acquavite ottenuta dopo fermentazione di melasse o di succo di canna de zucchero. La formazione degli alcooli superiori ubbidisce alle stesse regole osservate per le altre bevande fermentate.

Le condizioni della fermentazione possono spiegare l'importanza relativa dei tenori di ogni alcool superiore. Le prove in laboratoire menzionate nell'articolo sono state volontariamente limitate ai diversi parametri della fermentazione che si possono facilmente trasporre al livello industriale. E' apparso cosi che la scelta della specie e del genere di lievito rimangono i mezzi essenziali per controllare la formazione degli alcooli superiori.

Nuove prospettive sono egualmente aperte per lo studio dell'influenza della complementazione azotata del mezzo di fermentazione su questa produzione. Le prime prove mostrano che le quantità di alcooli superiori formati possono essere determinate, entro un certo limite, dalla natura della fonte d'azoto e dalle quantità aggiunte. Nello stesso tempo, è stato sottolineato il ruolo primordiale dell'acido cetobutirrico.

## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ARROYO R., 1945. Studies on Rum, *Research Bulletin* n° 5. University of Porto Rico, Agricultural Experiment Station.

ÄYRÄPÄÄ T., 1971. Biosynthetic formation of higher alcohols by yeast. Dependance on the nitrogenous nutrient level of the medium. *J. inst. Brewing*, **77**, 266-275.

DUBOIS P., FLANZY M., POUX C., DUPUY P., 1968. Fermentation du moût de raisin en continu. Formation des alcools supérieurs. *Ann. Technol. agric.*, **17**, 207-215.

ENGAN S., 1972. Aromakomponenter i Ø l — I HØyere alkoholer. *Brigmesteren*, **29**, 137-153.

GRATCHEVA I. M., BARTENEV U. S., VIZEL'NAM B. B., 1973. Influence de la grandeur de l'ensemencement sur l'accumulation de la biomasse des levures *Saccharomyces carlsbergensis*, souche x I, sur la durée de la fermentation et de la formation des alcools supérieurs. *Prikladnaya biolhimiga i mikrobiologuiya*, **9**, 653-658-(en russe).

GUYMON J. F., INGRAHAM J. L., 1960. The formation of higher aliphatic alcohols by mutant strains of *Saccharomyces*. *Arch. Biochem Biophys.*, **78**, 157-166.

GUYMON J. F., INGRAHAM J. L., CROWELL E. A., 1961. The formation of *n*-propyl alcohol by *Saccharomyces cerevisae*. *Arch. Biochem. Biophys.*, **95**, 163-168.

HARVALIA, DANILATOS, VASSILIOU, 1974. Relation entre la teneur des vins en alcools supérieurs et la teneur des moûts en substances azotées, en particulier en acides aminés. *XIV*e *Congrès international de la Vigne et du Vin*. Bolzano.

LIEBICH N. M., KOENIG W. A., BAYERY E., 1970. Analysis of the flavor of rum by gas liquid chromatography and mass spectrometry. *J. Chromato. Sci.* (8), 527-533.

MERRIT N., 1966. The influence of temperature on some properties of yeast. *J. Inst. Brewing*, **72**, 374-383.

MONTREAU F. R., DUFRENOT L., 1974. Sur les jus fermentés de quelques variétés de cannes. *Notes et informations CTCS*, **74**, 23-26.

PARFAIT A., NAMORY M., DUBOIS P., 1972. Les esters éthyliques des acides gras supérieurs des rhums. *Ann. Technol. agric.*, **21**, 199-210.

PARFAIT A., SABIN G., 1975. Les fermentations traditionnelles des mélasses et de jus de canne aux Antilles françaises. *Ind. alim. agric.*, **92**, 27-34.

RENZIN G., SCALES H., ANDERSEN A., 1973. Production of higher alcohols from threonine and isoleucine in alcoholic fermentation of different types of grain mash. *J. Agr. Food Chem.*, **21**, 50-54.

STEVENS R., 1960. Beer flavor volatile products of fermentation. *J. Inst. Brewing*, **66**, 453-471.

WEBB A. D., INGRAHAM J. L., 1963. Fusel oil. *Adv. appl. Microbiol.* (5), 317-353.

YOKOTA H., FAGERSON J. S., 1971. The major volatile components of cane molasses. *J. Food Sci.* **36** ,1091-1994.

*Ann. Technol. agric.*, 1975, **24** (3-4), 437-443.

# LA RÉGLEMENTATION FRANÇAISE DU RHUM ET SES PERSPECTIVES

R. PISANI

*Service de la Répression des Fraudes et Contrôle de la Qualité,*
*42 bis, rue de Bourgogne,*
*75007 Paris*

## RÉSUMÉ

Cet exposé comprend un rappel de la réglementation se rattachant tant à la loi organique du 1er août 1905 sur la répression des fraudes et des falsifications des denrées alimentaires et des produits agricoles qu'aux principales dispositions législatives et fiscales tendant à protéger le produit contre ses imitations frauduleuses.

Il apparaît cependant que, pour importante qu'elle soit comme moyen de circonscrire les problèmes, le rappel de cette réglementation est moins séduisant pour des professionnels, somme toute informés de ces dispositions et animés dans leurs pays respectifs des mêmes soucis que ceux ayant inspiré le législateur français, que peuvent l'être à leurs yeux les tendances probables de la production et du commerce pour une adaptation aux conditions du marché et aux goûts des différentes clientèles.

Il s'agit là d'un sujet vaste, peut-être trop ambitieux dans les aspects de l'économie des systèmes existants, et des philosophies qui peuvent aider à les concevoir. Mais notre but sera cependant atteint si, dans la mesure même où, trouvant de nombreuses imperfections à cet exposé, on sera conduit à en prendre conscience pour tenter de les résoudre à la fois dans le double intérêt des professionnels concernés et des individus intéressés à la chose, soit par l'intérêt social qu'elle présente pour leur région, soit par celui commun à tous les consommateurs.

Il est toujours difficile de commenter une réglementation nationale devant un aréopage de représentatants de divers pays. On risque en effet de paraître manquer de modestie et de tenter d'exporter les principes de sa réglementation. Aussi, dans tout ce qui va suivre, nous appliquerons-nous à serrer la vérité au plus près et, après avoir commenté la réglementation actuelle du rhum en France, à donner un gage d'objectivité en exposant les remarques qu'elle suscite et même les améliorations qu'elle peut paraître appeler.

Dans cet exposé, le fonctionnaire du Service de la Répression des Fraudes ne saurait se départir des préoccupations dominantes de son Service, savoir, d'une part, le maintien et la promotion de la qualité et, d'autre part, la défense des intérêts du consommateur et du commerce honnête.

## QUALITÉ EN GÉNÉRAL

Il est bon, en premier lieu, de tenter de saisir le sens du mot « qualité ».

Jusqu'à ces dernières années, on pensait que la qualité ne se définit pas, qu'elle se constate, et la notion que l'on peut en avoir à ce sujet est toujours valable.

C'est cette notion qui apparaît à travers la loi française du 6 mai 1919 sur les appellations d'origine, instrument juridique qui permet de repérer un type de produit par référence à l'aire géographique de sa production. Il s'agit là de la qualité innée, de la qualité naturelle.

Sur cette idée de « qualité naturelle » vient se superposer, depuis quelque temps, une nouvelle notion de la qualité, celle que l'on attend des infléchissements de la qualité naturelle par l'intervention de facteurs humains tendant à adapter un produit au goût de la clientèle ; il s'agit là alors de la qualité acquise.

Ces deux aspects de la qualité ressemblent étrangement aux deux aspects trouvés au nouvel esprit scientifique par le philosophe BACHELARD, qui pense que cet esprit ne doit plus participer d'une seule éthique, mais qu'il doit porter deux étiquettes : celle du réalisme et celle du rationalisme. La première correspond à la qualité naturelle constatée, la seconde à la qualité acquise, à celle résultant de normes telles qu'elles apparaissent, par exemple, du décret-loi du 30 juillet 1935 sur les appellations d'origine contrôlées, ou des dispositions du décret du 13 janvier 1965 sur les labels agricoles.

## QUALITÉ EN MATIÈRE DE RHUM

A ce sujet, on doit citer en premier lieu les dispositions générales du décret du 19 août 1921 concernant les eaux-de-vie que l'on peut qualifier de « naturelles », dispositions aux termes desquelles il est interdit de détenir ou de transporter en vue de la vente, de mettre en vente et de vendre sous les dénominations fixées à l'article 6 de ce texte, des produits autres que ceux ayant, aux termes dudit article, un droit exclusif à ces dénominations.

Ce même texte précise ensuite que la dénomination de rhum ou de tafia est réservée à l'eau-de-vie provenant exclusivement de la fermentation alcoolique et de la distillation, soit des mélasses ou sirops provenant de la fabrication du sucre de canne, soit du jus de canne à sucre, non privé par défécation des principes aromatiques auxquels les rhums et tafias doivent leurs caractères spécifiques.

Je dois dire que cette définition du rhum paraîtrait insuffisante si elle n'attachait déjà, au sens français, au mot « rhum » un certain parfum d'exotisme, de telle sorte qu'on ne saurait concevoir que cette eau-de-vie soit produite dans des régions autres que celles où est récoltée la matière alcooligène dont elle provient.

Les dispositions précitées objet de l'article 6 de ce décret sont complétées par celles de l'article 8 considérant comme frauduleuses les manipulations et pratiques destinées à améliorer et bouqueter les eaux-de-vie naturelles, en vue de tromper l'acheteur sur les qualités substantielles, leur origine ou leur espèce ; donner à des

spiritueux destinés à la consommation, sous quelque nom que ce soit, les caractères d'une eau-de-vie naturelle, en faussant les résultats de l'analyse.

Les diverses formulations de ces considérations ont, par la suite, paru insuffisantes pour éviter qu'une confusion ne s'établisse entre les eaux-de-vie en général et l'alcool éthylique. C'est dans ce souci que, par un décret du 28 juin 1938, le législateur a introduit dans la réglementation une nouvelle notion, celle des « spiritueux rectifiés », avec lesquels les eaux-de-vie ne doivent pas être confondues.

Ce texte a d'abord précisé que les eaux-de-vie naturelles définies perdaient tout droit au bénéfice des dénominations correspondantes lorsqu'elles présentaient le caractère de spiritueux rectifiés. Il a ensuite défini ces spiritueux rectifiés de deux façons ; par la première, il a disposé que c'étaient les spiritueux ne présentant pas les caractères des eaux-de-vie naturelles ; cette définition pourrait paraître une lapalissade si elle n'impliquait pas déjà l'existence de qualités organoleptiques typiques ; par la seconde, le texte a défini ces spiritueux rectifiés comme étant ceux ne possédant pas une teneur en éléments volatils autres que l'alcool (acides, éthers, aldéhydes, furfurol et alcools supérieurs) au moins égale à 280 grammes par hectolitre d'alcool pur.

Poursuivant dans cette voie, le législateur, par le décret du 25 juillet 1963, a défini le « rhum vieux » comme étant celui possédant un taux d'éléments volatils autres que l'alcool au moins égal à 325 grammes par hectolitre d'alcool pur, acquis après un vieillissement d'au moins trois ans en fûts de chêne d'une capacité de 650 litres au plus.

On pourrait dire aussi que cette référence à un taux global d'éléments volatils autres que l'alcool n'est pas suffisamment symptomatique de la nature du produit, et qu'il serait préférable de trouver un lien plus direct entre sa nature et sa qualité par référence à l'un des constituants de ce taux global d'éléments volatils. Nous savons que jusqu'ici cet espoir n'a pas été réalisé, et ce symposium serait très largement positif s'il permettait d'aboutir dans ce sens, comme certaines publications permettent de l'espérer. Dans cette attente, nous verrons par la suite comment la référence à un taux global de non alcool combinée à des dispositions fiscales permet l'exercice d'un contrôle judicieux.

## ÉVOLUTION DE LA NOTION DE QUALITÉ POUR LE RHUM

Mais il est apparu, dès la publication du décret du 28 juin 1938, que les exigences relatives au taux d'éléments volatils autres que l'alcool s'avéraient trop sévères pour les rhums, qui n'atteignaient pas toujours la plénitude de leur qualité en ce domaine dès la sortie des distilleries.

C'est la raison pour laquelle, par une circulaire du 10 mars 1939, il a été décidé de déroger provisoirement à cette exigence et que, par une lettre en date du 29 janvier 1962, cette dérogation a dû être prorogée *sine die*.

Pour libérale qu'elle soit, une telle dérogation ne pouvait être satisfaisante dès l'instant qu'elle ne fixait pas une limite minimum se substituant aux 280 grammes par hectolitre d'alcool pur précités. Et c'est ainsi que par une circulaire du 30 mars 1971, en s'appuyant sur l'expérience, on a admis que ce taux de 280 grammes pou-

vait être diminué de 20 p. 100 et ramené de ce fait, sans inconvénients, à 224 grammes pour le rhum « traditionnel ».

Dans le même temps, constatant l'évolution du goût de certaines clientèles en faveur d'un rhum à caractères organoleptiques plus subtils, il a été admis que ce taux pourrait même être abaissé à 60 grammes pour les rhums dits « légers ».

La situation s'est trouvée compliquée par l'adoption de nouvelles méthodes d'analyse, objet de l'arrêté du 31 juillet 1973; recourant à la chromatographie, ces méthodes de dosage des éléments volatils autres que l'alcool permettent maintenant de saisir des portions d'alcools supérieurs qui échappaient antérieurement aux analyses classiques, de telle sorte que pour obtenir des produits identiques à ceux prévus par les textes en vigueur, on devrait être conduit à exiger des taux supérieurs, les taux anciens de 280 ou 224 grammes par hectolitre d'alcool pur correspondant à peu près à 350 ou 300 grammes, alors que le taux antérieur de 60 grammes pour le rhum léger correspondrait à peu près à 90 grammes suivant la nouvelle méthode.

Cette transposition logique se trouve précisément contrecarrée par la recherche d'une qualité de rhum à caractère plus subtil pour le rhum traditionnel, de telle sorte que, pour ce produit, l'augmentation du taux du fait de la transposition précitée se trouve compensée par la nécessaire diminution de ce taux à 225 grammes, par exemple, en vue de répondre à une nouvelle qualité.

Une diminution proportionnelle ne saurait toutefois être envisagée pour le rhum léger, dont le taux d'éléments volatils autres que l'alcool devrait être maintenu à 90 grammes par hectolitre d'alcool pur pour disposer de produits ayant encore les caractères organoleptiques caractéristiques du rhum.

## MOYENS DE REPÉRAGE DE LA QUALITÉ

La qualité des rhums est d'abord repérée par référence à des appellations d'origine simples, permettant leur identification en se référant à leur aire de production géographique conformément à cette notion déjà exposée de qualité innée ou naturelle. Cette notion d'appellation d'origine simple pour le rhum s'est trouvée confirmée dans des circulaires du Service de la Répression des Fraudes des 10 juin 1930 et 16 février 1932. Plus récemment, on s'est orienté vers l'autre notion — celle de qualité acquise — en recourant à un label dans le cadre du décret du 13 janvier 1965 sur les labels agricoles, décidant de n'attribuer ce label qu'aux rhums répondant à certaines conditions de production et de composition.

Enfin, on s'oriente dans la voie des appellations d'origine réglementées, où les conditions de production s'ajoutent aux notions d'origine.

Dans ces deux derniers cas, on sacrifie à la notion de qualité acquise la qualité normative.

## PRÉSENTATION, ÉTIQUETAGE

C'est à ce titre que se manifeste l'autre souci du Service de la Répression des Fraudes, touchant la défense des intérêts du consommateur et l'honnêteté des transactions commerciales.

Il est apparu en effet que les dispositions précitées seraient inopérantes sans la possibilité de contrôler la présentation et la circulation des produits. Disons à ce titre déjà qu'à l'inverse de certaines eaux-de-vie, le décret du 19 août 1921 n'a pas permis l'élaboration de produits de fantaisie ou aromatisés artificiellement obtenus à partir de rhum ou rappelant le rhum.

La loi du 31 décembre 1922 a donné à cette exclusive un caractère positif en interdisant de désigner comme rhum tout alcool ne correspondant pas à la définition de ce produit.

La loi du 16 avril 1930 a interdit de présenter sous un nom quelconque tous spiritueux mélangés, aromatisés, colorés ou non, présentant ses caractères organoleptiques sans correspondre exactement à la définition donnée.

L'article 4 de cette loi a interdit l'emploi du mot « rhum » dans toute publicité pour des produits autres que celui défini comme rhum.

Complétant cette exigence, les articles 3 et 4 du décret du 18 juin 1938 ont proscrit en outre toute autre dénomination (telle qu' « eau-de-vie de canne ») pour le rhum et l'emploi du qualificatif « grand arôme » pour toute eau-de-vie autre que le rhum

Cet ensemble de dispositions verticales se trouve complété maintenant, depuis le décret n° 72-937 du 12 octobre 1972, par des dispositions horizontales communes à tous les produits préemballés pour leur présentation et leur étiquetage.

Ainsi, à l'exigence fiscale de l'indication du degré, s'ajoute l'obligation d'une dénomination (« rhum ») et de mentions relatives au producteur (cf. art. 3) ainsi que d'une mention permettant d'identifier l'embouteilleur (cf. art. 6).

Mais s'agissant d'une eau-de-vie naturelle, un arrêté du 16 novembre 1973 est venu dispenser les eaux-de-vie telles que le rhum de la mention de leurs composants et de l'indication des additifs reçus, puisque le seul composant est l'eau-de-vie et que les additifs ne peuvent être que du caramel et des infusions de copeaux de chêne.

Enfin, un arrêté du 8 novembre 1973 modifié le 21 juin 1975 a fixé les volumes préétablis de mise en vente des rhums pour éviter toute confusion sur les volumes.

## SYSTÈME D'IDENTIFICATION DES PRODUITS

Cet exposé serait incomplet s'il ne faisait référence aux dispositions fiscales soumettant la circulation des produits à une identification par des pièces de régie pouvant permettre, le cas échéant, d'en suivre les origines conjointement avec les comptes tenus en fonction de ces origines conformément aux dispositions des textes.

C'est sur ce point particulier de la conjonction de la réglementation relative à la répression des fraudes et de la réglementation fiscale française qu'il convient d'insister particulièrement puisque ces instruments réglementaires permettent, après avoir défini les rhums à la production, de leur délivrer des actes de naissance les suivant dans tout le circuit de leur commercialisation jusqu'au commerçant détaillant, comme permettait de le faire d'ailleurs une ancienne filière boursière transmissible, transférable et représentative de la marchandise à tous les stades de sa commercialisation.

A ce sujet, comparant l'étiquette à une image, on ne peut s'empêcher de se référer à ce passage de MERLEAU PONTY suivant lequel « l'image n'est qu'un reflet de la mécanique des choses » et qu'il est nécessaire que l'esprit établisse un lien entre l'image et l'objet pour que celle-là soit représentative de celui-ci. Ce lien existe à travers la pièce de régie dans la réglementation française, dont le caractère fiscal est passé au second plan quand ce système, devenant alors celui du document d'accompagnement, a été adopté en matière de circulation des vins par divers pays européens.

En guise de conclusion, on peut donc dire que, pour perfectible qu'elle soit, la réglementation ainsi décrite réunit l'essentiel des moyens de garantie de la qualité.

*Reçu pour publication en août 1975.*

## SUMMARY

### THE PRESENT AND PERSPECTIVE LEGISLATION IN FRANCE CONCERNING RUM

This paper comprises a recall of the legislation connected with the constitutional law of 1st August 1905 on the repression of fraudulence and adulteration of foodstuffs and agricultural produce and the main legislative and fiscal clauses aiming to protect the product against fraudulent imitations.

However, it appears that important as a recall of this legislation is, as a means of containing the problems, to professionals who are already aquainted with its clauses and are having the same troubles in their respective countries as those behind the French legislation, it is less useful than would be the probable trends of production and commerce adaptation to marketing conditions and the preferences of different customers.

This is a vast subject, perhaps too ambitious concerning the present economical aspects and the underlying philosophies. We shall, however, have acheived our object if on finding this paper inadequate, one is thus made aware of the necessity of improving ones knowledge to the two-fold advantage of the professionals involved and the social regional benefit to the individuals concerned and to the consumers as a whole.

## RESUMEN

### LA REGLAMENTACIÓN FRANCESA DEL RON Y SUS PERSPECTIVAS

Este informe comprende un resumen relativo a la reglamentación referente a la ley orgánica del 1º de agosto de 1905 aplicable a la represión de fraudes y falsificación de artículos alimentarios y de los productos agrícolas, así como a las principales disposiciones legislativas y tributarias tendientes a proteger el producto contra sus imitaciones fraudulentas.

No obstante, puede apreciarse que, por importante que sea como medio de circunscribir los problemas, la referencia a esta reglamentación es menos seductora para los profesionales, dado que éstos se encuentran informados de estas disposiciones y están animados, en sus países respectivos, de las mismas preocupaciones que han servido de inspiración al legislador francés, que pueden serlo a su parecer las tendencias probables de la producción y del comercio para una adaptación a las condiciones del mercado y a los gustos de las distintas clientelas.

Se trata aquí de un tema de gran amplitud, posiblemente demasiado ambicioso en los aspectos de la economía de los sistemas existentes, y e las filosofías que pueden ayudar a su concepto. Creemos que nuestro objetivo sería alcanzado si, a pesar de las numerosas imperfecciones de este informe, se ilegase a tomar conciencia para intentar su resolución tanto en el doble interés de los profesionales alcanzados y de los individuos que se interesan por el problema, ya sea por el interés social que presenta para su región, o bien, por el interés común de todos los consumidores.

## RIASSUNTO


### LA REGOLAMENTAZIONE FRANCESE DEL RUM E LE SUE PROSPETTIVE

Questo articolo vuole essere un richiamo della regolamentazione concernente sia la legge organica del 1° agosto 1905 sulla repressione delle frodi e delle falsificazioni delle derrate alimentari e dei prodotti agricoli come pure le principali disposizioni legislative e fiscali che mirano alla protezione del prodotto contro le imitazioni fraudolenti.

Appare tuttavia che, per quanto importante possa essere come mezzo per circoscrivere i problemi, il richiamo di questa regolamentazione appare meno importante agli occhi dei professionistiche, in fin dei conti, sono informati di questa disposizione e che, nei loro rispettivi paesi, hanno le stesse preoccupazioni del legislatore francese, appare meno importante dicevamo dell'informazione sulle tendenze possibili della produzione e del commercio per un opportuno adattamento alle condizioni del mercato e ai gustidei diversi clienti.

Si tratta qui di un vasto soggetto, forse troppo ambizioso nel quadro degli aspetti dell'economia dei sistemi esistenti e delle filosofie che possono aiutare a concepirli. Considereremo non di meno di aver raggiunto il nostro scopo se, nella misura stessa in cui trovando numerose imperfezioni a questo articolo, se ne prenderà coscienza per tentare di risolverle sia nell'interesse dei professionisti e delle persone cui questo problema riguarda, sia per l'interesse sociale che questa regolamentazione presenta per la loro regione, sia per l'interesse comune a tutti i consumatori.

*Ann. Technol. agric.*, 1975, **24** (3-4), 445-451.

# THE GROWTH OF FILAMENTOUS FUNGI ON RUM DISTILLING SLOPS

C. ROLZ, S. de CABRERA, R. ESPINOSA, O. MALDONADO and J. F. MENCHU

*Applied Research Division,*
*Central American Research Institute for Industry (ICAITI),*
*P. O. Box 1552, Guatemala (Guatemala, C. A.)*

## SUMMARY

An introduction is given of the possible technical systems available to treat rum distilling slops. Results are presented for the growth of filamentous fungi on slops from virgin syrups as obtained from a Guatemalan distillery. Sixteen different species of fungi were tested in shake flask experiments from which five were selected as the best ones in optimizing mycelial yields and soluble COD reduction. With nitrogen and phosphorus supplementation, reductions from 56 to 85 p. 100 of soluble COD were observed and mycelial yields of 11 to 19 g/l obtained. Results of continuous cultivation in laboratory fermentors are also presented, where COD reduction values of 50 to 60 p. 100 were obtained.

## INTRODUCTION

In the processing of the rum industry after the alcoholic fermentation of cane molasses or virgin syrups, the unit operation commonly employed to concentrate the ethyl alcohol produced is distillation. It has been common practice to feed the alcoholic mash directly into the plate column, generating then two principal streams : the heads rich in alcohol and the bottoms practically stripped of ethyl alcohol. The bottom flow is commonly named slops, stillage or spent wash. However, there exists the alternate scheme, where prior to distillation, the yeast produced during the anaerobic fermentation is removed by centrifuging and the clear alcoholic liquor is fed to the distillation column as before. The difference is that in the second case the slops do not contain the chemical products formed by the thermal degradation of the yeast cells in the fractionating tower. Industry has not used this scheme much before, mainly because the appropriate markets for a dried yeast product have not been developed. The two processes are illustrated in figure 1.

The slops from the distillation step represent the major liquid waste fo the rum industry. In the past, they have been either dumped away or in some cases, concentrated by evaporation and drum dried, to produce the so called « distillers solids ». Due to a worldwide effort to reduce pollution, two approaches for treatment of the slops have been suggested : an anaerobic system producing methane gas and sludge, and an aerobic system for the growth of filamentous fungi to be used as an animal feed. These alternatives are illustrated in figure 2.

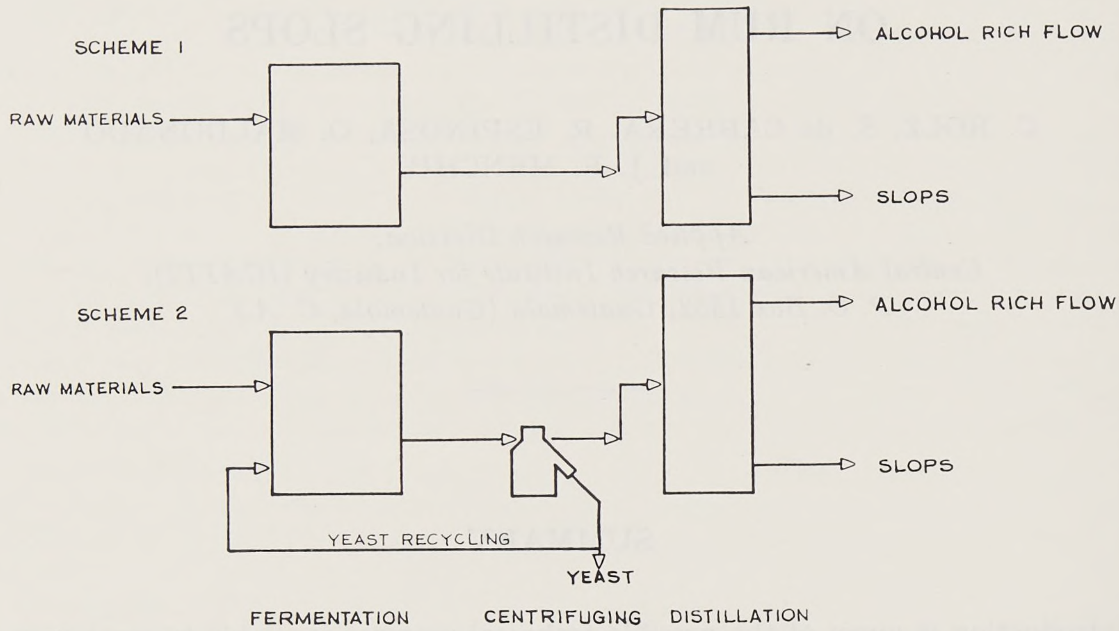



FIG. 1. — *Alternatives for rum distilling*

In order to select from all these technical alternatives, it is necessary to make an economic assessment of each one as it applies to each case or rum distillery analyzed. Specific local conditions may incline the balance towards a particular design. This is beyond the goals of the present work which was directed towards testing at a laboratory level the growth of a series of filamentous fungi on slops from a Guatemalan rum distillery.

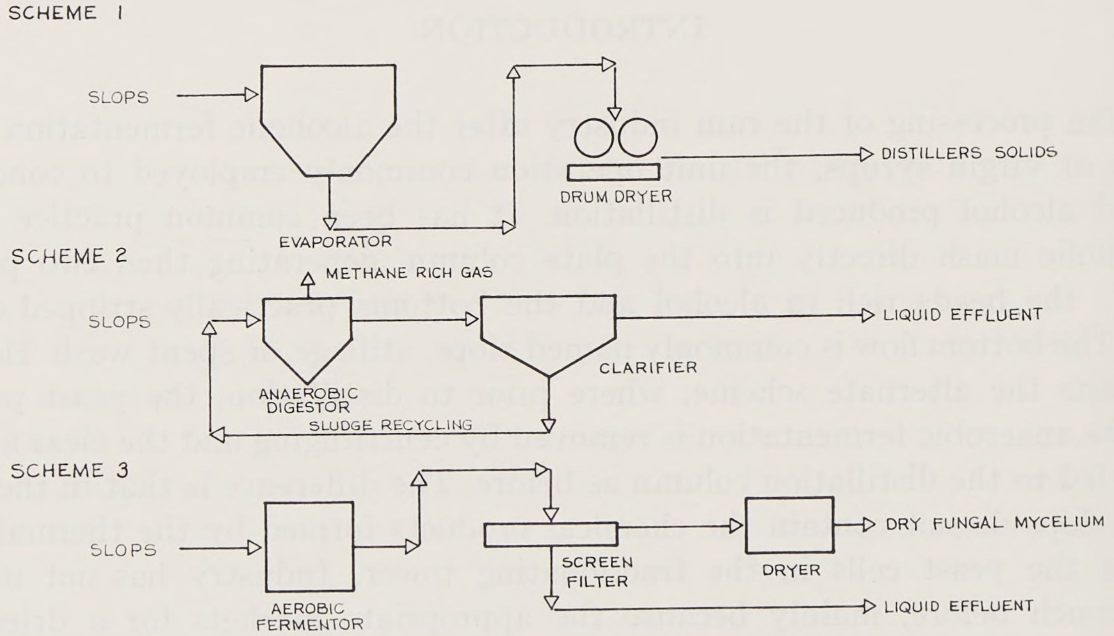



FIG. 2. — *Alternatives for slops treatment*

## MATERIALS AND METHODS

The slops were obtained as produced from the distillery. They were either canned and sterilized or kept fresh frozen. They were characterized for total and dissolved COD and phosphorus (A.P.H.A., 1955), carbohydrates (WHISTLER, 1962), organic and inorganic nitrogen (A.O.A.C., 1965) and total and dissolved solids by drying at 105°C for 24 hours.

Stock cultures of the test fungi were grown on potato-dextrose agar slants at 30°C until good sporulation was obtained. The spores were then washed from the agar-slant cultures with 5 ml of sterile spent wash, pH 3.5, and 0.1 ml of this suspension was used to inoculate 10 ml of sterile spent wash, pH 3.5, in baffled 50 ml shake flasks. The flasks were incubated at 30 or 35°C with agitation at 350 r.p.m. for two days. These cultures were employed to inoculate a second batch of flasks of the same medium which were incubated for five days at 30°C and 350 r.p.m. after visible growth in the flasks. All the flasks were analyzed by visual and microscopic observation, final pH and COD of the liquid supernatant obtained by centrifugation ; in some cases, mycelial weight and total nitrogen of the mycelium were also obtained. The former was done by centrifuging a sample at 3 000 r.p.m. for 20 minutes and drying at 105°C to constant weight.

In some cases fermentations were done in 5 l stirred jar fermentors operated at 35°C, 0.5 v.v.m. at 250-400 r.p.m. The inoculum for the tanks was a two day incubated shake flask.

## RESULTS AND DISCUSSION

The chemical composition of the slops produced in the Guatemalan distillery are shown in table 1, and compared to similar values reported recently for a Puerto Rican distillery (SHEA *et al.*, 1974). Note that rather striking difference in chemical composition between the Guatemalan slops produced either with virgin syrups or blackstrap molasses. The first ones are used in the production of rum and the second ones in the production of industrial alcohol, a situation that exists in this country by law. The spent wash from blackstrap molasses are similar to the Puerto Rican, values, with the exception of total phosphorus which is significantly higher for the Guatemalan spent wash.

TABLE I

*Chemical analysis of the slops*

| Component (g/l) | Guatemalan spent wash from virgin syrups | Guatemalan spent wash from blackstrap molasses | Reported range for Puerto Rico (SHEA *et al.*,1974) |
|---|---|---|---|
| Total COD ......... | 47.30 | 73.90 | 83.8-115.5 |
| Dissolved COD ..... | 44.80 | 68.60 | 81.1-106.3 |
| Total solids ........ | 31.00 | 62.00 | 70.2-95.8 |
| Dissolved solids .... | 31.00 | 60.00 | 69.8-85.6 |
| Organic nitrogen (Kjehldahl) ....... | 0.31 | 0.80 | 0.77-1.28 |
| Inorganic nitrogen .. | $<$ 0.015 | $<$ 0.015 | 0.02-0.17 |
| Total phosphorus ... | 0.11 | 0.18 | 0.059-0.098 |

Sixteen different identified species of filamentous fungi were screened in shake flask experiments employing sterilized spent wash at pH 3.5 and 5.0 with or without 1 p. 100 of $(NH_4)_2HPO_4$ as supplement, for five days incubation at 30°C and 350 r.p.m. Five species were selected on the basis of better COD reduction and higher mycelial yields. These are identified as follows : *Trichoderma viride* I-189, *Gliocladium deliquescens* I-31, *Paecilomyces elegans* I-134, *Myrothecium verrucaria* P-9 and *Penicillium* sp. B-71.

With these five fungi, a series of shake flask experiments were done for 5-6 days of incubation at 350 r.p.m., again with sterilized spent wash from virgin syrups. Two temperatures were chosen (30 and 35°C), five pH values (3, 4, 5, 6 and 7) and four different nutrient supplements, *a* : 1 p. 100 $(NH_4)_2HPO_4$ ; *b* : trace element solution, 1 ml/l of medium ; *c* : 0.1 p. 100 yeast extract ; *d* : 0.03 p. 100 urea. The initial conditions which optimized mycelial mass production and soluble COD reduction are given in table 2. With the exception of *M. verrucaria*, P-9 and *Penicillium* B-71, the fungi grew well at both 30 and 35°C, favoring lower initial pH values, and nitrogen addition and buffering (supplmeent *a*). *G. deliquescens*, 1-31 was the specie that best responded with an average yield of 0.462.

TABLE 2

*Cultures and conditions which gave the highest mycelial yields*

| Cultures | Net gain dry cell mass (g/l) | Soluble COD reduction (%) | Initial pH | Final pH | Temperature (°C) | Average yield Yx/s (1) | Medium Supplement |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| *Trichoderma viride* I-189 .......... | 12-16 | 59-79 | 4-5 | 3.2-6.8 | 30-35 | 0.467 | *a, b, c, d* |
| *Gliocladium deliquescens* I-31 ..... | 11-19 | 60-85 | 4-7 | 4.2-7.1 | 30-35 | 0.462 | *a, b* |
| *Paecilomyces elegans* I-134 ........ | 11-14 | 62-66 | 3-5 | 5.8-7.2 | 30-35 | 0.435 | *a, b, d* |
| *Myrothecium verrucaria* P-9 ....... | 11-12 | 79-82 | 5-7 | 5.4-6.1 | 30 | 0.32 | *a, b* |
| *Penicillium* sp. B-71 ............. | 12-16 | 65 | 5-7 | 4,6-6.8 | 30 | 0.463 | *a, b* |

(1) Yx/s = yield of cell mass (g/l)/substrate consumption COD (g/l).
*a* : 1 p. 100 $(NH_4)_2HPO_4$ ;
*b* : Trace element solution 1 ml/l of medium ;
*c* : 0.1 p. 100 yeast extract ;
*d* : 0.03 p. 100 urea.

An experiment was also done with sterilized and non-sterilized slops from virgin syrups, incubating at 30°C, 350 r.p.m. for 5 to 6 days ; an initial pH of 4.5 and a 1 p. 100 $(NH_4)_2HPO_4$ supplement in all flasks. Results are shown in table 3. It can be visulized that operating under non-aseptic conditions tends to decrease slightly the p. 100 COD reduction, but in general the behavior is similar. A non-aseptic control was run simultaneously and only a 28 p. 100 soluble COD reduction was observed, mainly due to the natural microflora present in the slops.

The results of two experiments in laboratory agitated fermentors are shown in figure 3. The fungi employed was *G. deliquescens*, 1-31 on virgin syrup slops. The tank was inoculated with a two day shake flask representing 10 p. 100 of the fermentor volume, and the fungi was grown batchwise at pH 3.5 until a substantial COD reduction was obtained. At that moment, continuous cultivation was started.

TABLE 3

*Shake flask experiments under aseptic and non aseptic conditions*

| Culture | Final pH | | Soluble COD reduction (%) | |
|---|---|---|---|---|
| | aseptic | non aseptic | aseptic | non aseptic |
| *Trichoderma viride* I-189 .......... | 4.7-4.8 | 4.6-4.7 | 71.5-73.9 | 64.5-71.0 |
| *Gliocladium deliquescens* I-31 ....... | 4.3 | 4.6-5.1 | 76.1 | 70.8-74.4 |
| *Paecilomyces elegans* I-134 .......... | 4.8-4.9 | 4.7-4.8 | 72.2-86.6 | 67.2-76.1 |
| *Myrothecium verrucaria* P-9 ........ | 4.5-4.7 | 4.6-4.9 | 68.7-77.2 | 71.8-77.7 |

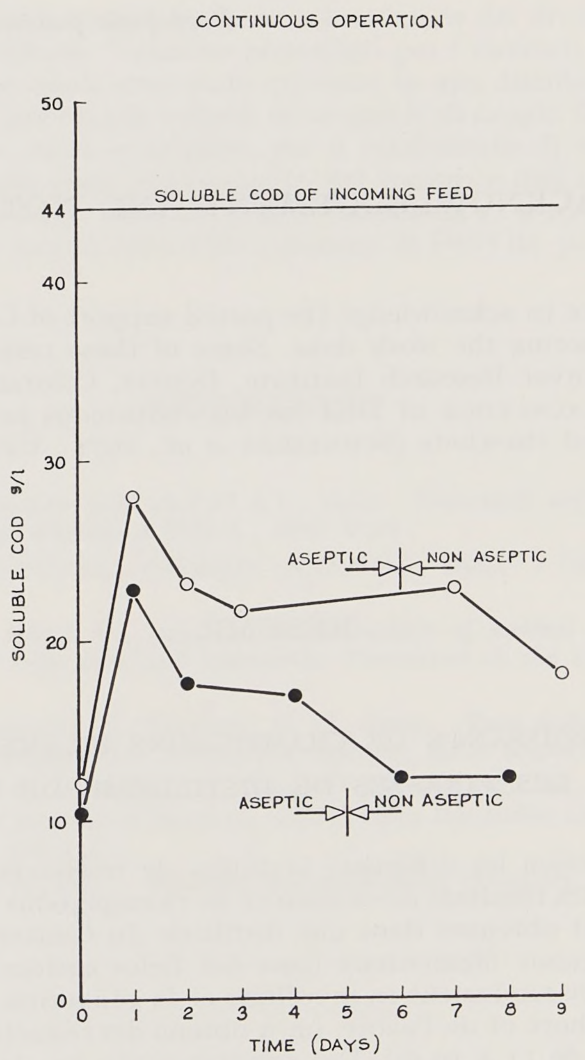



FIG. 3. — *Submerged fermentor trials*
● Fermentor A
○ Fermentor B

Fermentor A was a New Brunswick 5 l set up, with 3 l effective volume, 400 r.p.m., 35°C and 0.5 v.v.m. of air flow. Fermentor B was a Fermentation Design 5 l set up, with 2.5 l effective volume, 250 r.p.m., 35°C and 0.5 v.v.m. of air flow. The media was supplemented with 1 p. 100 $(NH_4)_2HPO_4$. Continuous aseptic fermentation with a dilution rate of 0.03 $hr^{-1}$ was carried out for six and five days respectively and then non-sterile media was fed to the system for another 3 and 4 days of operation. Both systems behaved in a more or less similar manner. During the first two days of continuous operation, the COD stabilized itself to the steady state value corresponding to the dilution rate employed. For Fermentor A, this was around 17 g/l and for Fermentor B around 22 g/l ; these figures correspond to a 61 and 50 p. 100 COD reduction respectively. Once the system was under non aseptic continuous culture condition, the amount of contaminants, mainly wild yeast, increased to a point where they were predominant in the tank. However the COD reduction values obtained incontinuous culture, even at such a low dilution rate, compare well with the shake flask values.

These results, although preliminary in nature, do show that the five fungi selected in this study, are able to reduce up to 60 p. 100 the soluble COD values of the rum distillery slops, value that could still be increased, and hence this treatment process should be considered as technically feasible when designing a system for a particular case.

*Reçu pour publication en septembre 1975.*

## ACKNOWLEDGEMENT AND NOTE

The authors would like to acknowledge the partial support of Central Añejadora, S.A., Guatemala for partially sponsoring the work done. Some of these results were obtained working in collaboration with the Denver Research Institute, Denver, Colorado, U. S. A. and recognition is given to Dr. James BLACKLEDGE of DRI for his continuous encouragement. Some of these results have been discussed elsewhere (SCHNEIDER *et al.*, 1971 ; UPDEGRAFF *et al.*, 1973).

## RÉSUMÉ

### LA CROISSANCE DE CHAMPIGNONS FILAMENTEUX SUR LES VINASSES DE DISTILLERIE DE RHUM

On décrit en introduction les différents systèmes de traitements applicables aux vinasses de distillerie. On présente les résultats de croissance de champignons filamenteux sur des vinasses de sirop telles qu'elles sont obtenues dans une distillerie du Guatemala. On a essayé la culture de 16 espèces de champignons filamenteux dans des fioles agitées. Cinq ont été sélectionnées comme les meilleures pour le rendement en mycélium et la réduction de la DCO soluble. En supplémentant avec du phosphore et de l'azote, on a obtenu des réductions de DCO de 56 à 85 p. 100 et des poids de mycélium de 11 à 19 g/l. Des cultures continues dans des fermenteurs de laboratoire ont donné des réductions de DCO de 50 à 60 p. 100.

## RESUMEN


### EL CRECIMIENTO DE LOS HONGOS FILAMENTOSOS EN LOS RESIDUOS DE DESTILACION DEL RON

En la introducción de este artículo, se describen los distintos sistemas de tratamientos aplicables a los residuos de destilación. Se presentan los resultados de crecimiento de hongos filamentosos en los residuos de destilación de jarabes, tal como son obtenidos en una destilería de Guatemala. Se ha ensayado el cultivo de 16 especies de hongos filamentosos, en frascos agitados. Cinco de los mismos han sido seleccionados, ya que se consideran los mejores para el rendimiento en micelio y la reducción de la DCO soluble. Mediante una complemento de fósforo y de nitrógeno, se han obtenido reducciones de DCO de 56 a 85 p. 100 y pesos de micelio de 11 à 19 g/l. Los cultivos continuos en fermentadores de laboratorio han proporcionado reducciones de DCO de 50 a 60 p. 100.


## RIASSUNTO


### LA CRESCITA DEI FUNGHI FILAMENTOSI SULLE VINACCE DI DISTILLERIA DEL RUM

L'introduzione dello studio è costituita da una descrizione dei diversi sistemi di trattamento applicabili alle vinacce di distilleria. Vengono presentati poi i risultati di crescita di funghi filamentosi su vinacce di sciroppo quali sono state ottenute in una distilleria del Guatemala.

Per l'esperimento è stata provata la coltura di 16 specie di funghi filamentosi in fiale agitate. Cinque sono state selezionate come le migliori per il rendimento di micelio e per la riduzione della DCO solubile. Utilizzando come supplemento del fosforo e dell'azoto, sono state ottenute delle riduzioni di DCO da 56 a 85 p. 100 e dei pesi di micelio da 11 a 19 g/l. Delle colture continue in fermentatori di laboratorio hanno dato delle riduzioni di DCO da 50 a 60 p. 100.


## REFERENCES


American Public Health Association (A.P.H.A.), 1955. Standard methods for the Examination of water sewage and industrial wastes. A.P.H.A., New York.

Association of official Agricultural chemists (A.D.A.C.), 1965. « Official Methods of analysis ». A.D.A.C., Washington.

Schneider S., Espinosa R., Rolz C., 1971. *The production of animal feed by the growth of fungi on wastes from the coffee and rum distilling industries.* Presented at the III Central American Microbiology Congress, Guatemala.

Shea T. G., Ramos E., Rodriguez J., Dorion G. H., 1974. *Rum distillery slops treatment by anaerobic contact process.* US Environmental Protection Agency, EPA Report-660/2-74/074, Washington.

Updegraff D. M., Espinosa R., Griffin L., King J., Schneider S., Rolz C., 1973. The production of animal feed by the growth of fungi on wastes from the coffee and rum-distilling industries. *Devel. in. Ind. Microbiol.*, **41**, 317-324.

Whistler R. L., Wolfrom M. L., 1962. *Methods in carbohydrate chemistry*, **1**, Academic Press.

*Ann. Technol. agric.*, 1975, **24** (3-4), 453-467.

# QUELQUES ASPECTS GÉNÉRAUX DE LA COMPOSITION DE L'ARÔME DES BOISSONS ALCOOLIQUES

H. SUOMALAINEN

*Laboratoires de Recherche du Monopole de l'État Finlandais des Vins et Spiritueux (Alko), B.P. 350, SF-00101 Helsinki 10 (Finlande)*

## RÉSUMÉ

De manière inattendue, pour une grande partie, les mêmes composés apparaissaient dans les fractions volatiles de l'arôme de la bière, du vin et des boissons distillées telles que le whisky, le cognac et le rhum. Le procédé même de distillation influence lui aussi sur l'arôme des boissons distillées. Une comparaison de la composition de l'arôme de deux rhums des Antilles montre que ceux-ci sont qualitativement semblables, alors qu'ils présentent, quantitativement, des différences sensibles. Il existe quelques différences entre la composition en acides du rhum et celle du whisky et du brandy. On voit que les acides inférieurs, particulièrement l'acide propionique et l'acide butyrique, existent en plus grandes quantités dans le rhum. Après l'acide acétique, c'est l'acide propionique qui est le composant principal dans le rhum de la Jamaïque. La proportion moyenne d'acide valérique dans le rhum est plus élevée que dans le whisky et le brandy, et ce fait peut être utilisé pour distinguer le rhum des autres boissons distillées. La composition de l'huile de fusel dans le rhum de la Jamaïque est exceptionnelle. Elle contient des quantités considérables d'alcool *sec*-butylique, et même presque autant d'alcool *n*-propylique que d'alcool isobutylique. La présence de la prétendue « lactone de whisky », la $\gamma$-lactone de l'acide méthyl-3-hydroxy-4-caprylique, dans les vins et les boissons distillées implique que ceux-ci ont vieilli dans des barriques de chêne.

Les facteurs affectant l'arôme des boissons alcooliques ont été largement étudiés au cours des récentes décennies. On s'est efforcé surtout de déceler la composition détaillée de la fraction volatile de l'arôme (SUOMALAINEN et NYKÄNEN, 1968 ; SUOMALAINEN et RONKAINEN, 1968). De manière inattendue, on a découvert que, sur plus de 100 composants de l'arôme identifiés, pour une grande partie les mêmes composés apparaissaient dans les fractions volatiles de l'arôme de la bière (LAWRENCE, 1964 ; ROSCULET, 1970), du vin (DRAWERT et RAPP, 1966) et des boissons distillées telles que le whisky, le cognac et le rhum (SUOMALAINEN et NYKÄNEN, 1970). Outre la matière première utilisée pour produire la boisson, la levure et les conditions de

fermentation ont leur propre influence sur la composition de l'arôme. Les changements prenant place durant la maturation d'une boisson peuvent aussi en modifier la composition de l'arôme.

*Formation et apparition des esters*

Les esters, principalement les esters éthyliques des acides gras, constituent les plus importants composants de l'arôme des boissons alcooliques et forment, numériquement parlant, le groupe essentiel de la fraction de l'arôme. La levure utilisée et les conditions de fermentation ont un effet considérable sur la composition et le contenu en esters des boissons alcooliques. Le procédé même de distillation influence lui aussi l'arôme des boissons distillées.

L'effet spectaculaire de la distillation sur la composition de l'arôme d'une boisson ressort de la figure 1. Une comparaison de la composition de l'arôme de deux rhums

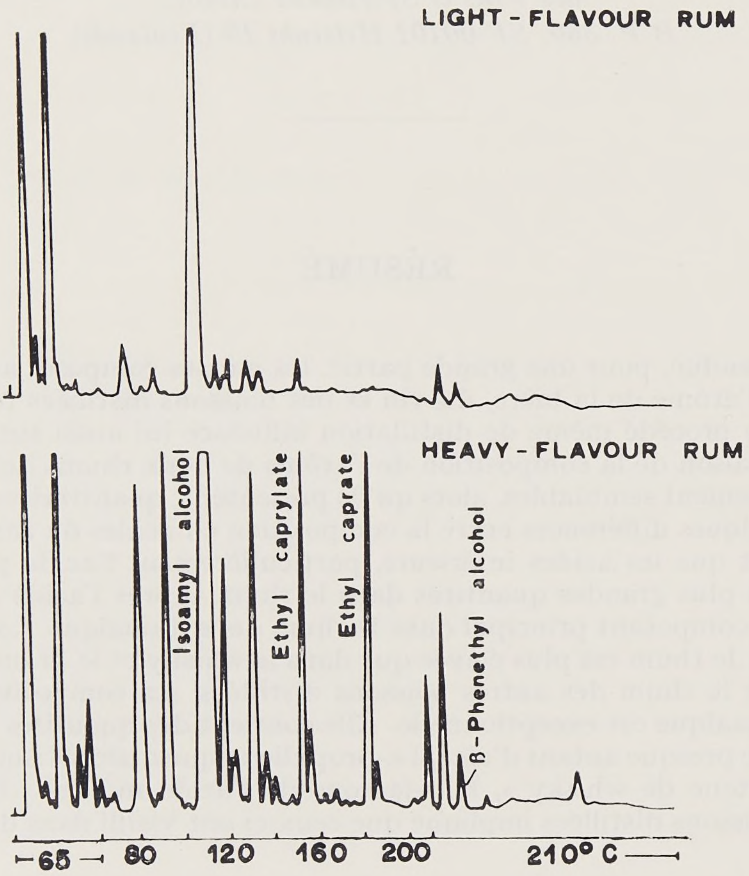



FIG. 1. — *Chromatogrammes en phase gazeuse des composés de l'arôme de deux rhums blancs produits aux Antilles*

(SUOMALAINEN et NYKÄNEN, 1970)

*Gas chromatograms of the aroma compounds of two white rums produced in the West-Indies*

(SUOMALAINEN et NYKÄNEN, 1970)

des Antilles montre que ceux-ci sont qualitativement semblables, alors qu'ils présentent, quantitativement, des différences sensibles. Les deux marques possèdent le même type d'arôme, mais avec une nette différence de force qui peut à la fois être sentie et analysée. PARFAIT *et al.* (1972) ont utilisé la chromatographie en phase gazeuse pour déterminer les esters éthyliques des acides gras supérieurs dans les rhums préparés par la fermentation du sucre par différentes levures. Selon cette

analyse, la levure a un effet très important sur la quantité d'esters formés. Un moindre contenu en esters a été décelé dans les rhums fermentés avec l'*Hansenula anomala* et la *Candida krusei*, et une plus grande quantité d'esters dans le mélange de fermentation et le rhum, s'agissant du ferment *Schizosaccharomyces pombe*. Ils ont montré également que le contenu en esters du rhum est plus élevé lorsque la levure n'est pas retirée avant la distillation.

Nous avons étudié, il y a déjà une dizaine d'années, le rôle joué par la levure dans la formation des arômes. Afin de voir dans quelle mesure la levure peut synthétiser différents constituants de l'arôme au cours de la fermentation, un distillat d'alcool obtenu d'une fermentation de saccharose sans azote à l'échelle du laboratoire et un whisky écossais ont été analysés par chromatographie en phase gazeuse dans des conditions équivalentes (SUOMALAINEN et NYKÄNEN, 1966 *a*). Les deux chromatogrammes sont similaires quant à la qualité (fig. 2), mais l'on peut observer une

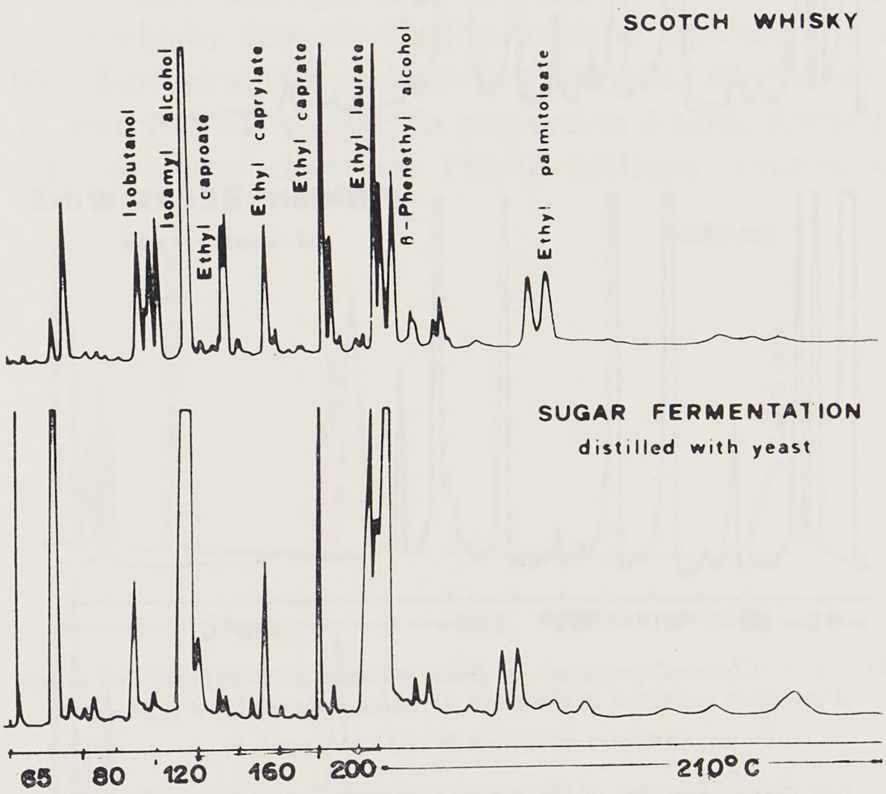



FIG. 2. — *Chromatogrammes en phase gazeuse des composés de l'arôme dans le whisky écossais et fermentation de saccharose sans azote par la levure*
(SUOMALAINEN et NYKÄNEN, 1966 *a*)

*Gas chromatograms of the aroma compounds in Scotch whisky and nitrogen-free sugar fermentation produced by yeast*
(SUOMALAINEN et NYKÄNEN, 1966 *a*)

nette différence dans les proportions des constituants de l'arôme. L'alcool isoamylique et l'alcool phénéthylique sont apparus comme des composants particulièrement importants dans la fermentation de sucre, et, en comparaison de la composition plus égale du whisky, les quantités d'esters dans la fermentation de sucre ont varié considérablement. La quantité d'esters dans le distillat a augmenté lorsque la distillation s'est produite en présence de levure, l'augmentation étant particulièrement évidente pour les esters des acides caprylique et palmitoléïque.

Nous avons aussi démontré le rôle essentiel de la levure dans la formation de l'arôme en comparant la composition de l'arôme d'un vin de baies finlandais de type

xérès avec celle d'un authentique xérès espagnol (fig. 3) (SUOMALAINEN et NYKÄNEN, 1966 *b*). Les deux vins avaient été obtenus par la méthode Solera. Les différences dans la composition des alcools, des acides et des esters dans les deux boissons, l'une provenant de groseilles finlandaises et l'autre de raisins espagnols, étaient étonnamment faibles. Il s'ensuit que la levure du xérès produit à peu près les mêmes constituants de l'arôme, que la matière première utilisée soit des raisins ou des baies.

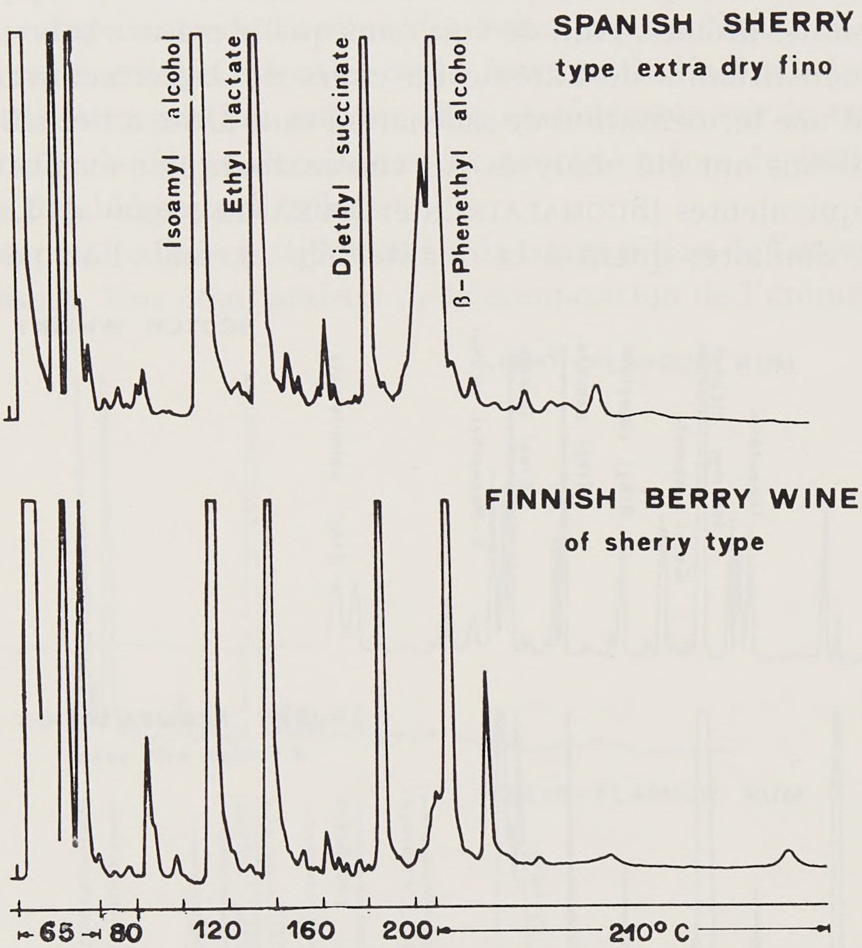



FIG. 3. — *Chromatogrammes en phase gazeuse des composés de l'arôme d'un xérès espagnol et d'un vin de baies finlandais de type xérès*

(SUOMALAINEN et NYKÄNEN, 1966 *b*)

*Gas chromatograms of the aroma compounds of a Spanish sherry and a Finnish berry wine of sherry type*

(SUOMALAINEN et NYKÄNEN, 1966 *b*)

Bien que la composition qualitative des arômes semble très similaire dans les différentes boissons et que, pour la plupart, la levure donne les mêmes constituants de l'arôme au cours de la fermentation, des variations considérables peuvent se produire dans les quantités des composants. Dans certains cas, il a été possible de prouver que de telles variations ont eu pour cause l'emploi de différentes souches de levures. WEBB et KEPNER (1961) à Davis, en Californie ont découvert que les différentes souches de levures causaient des variations sensibles dans les proportions relatives des alcools de fusel formés. A cet égard, les levures du Bourgogne et du Jerez, par exemple, sont similaires et produisent une grande quantité d'alcool propylique et moins d'alcool isoamylique, alors qu'avec la levure de Montrachet les proportions relatives sont inversées. Récemment, DAUDT et OUGH (1973) ont examiné la formation des esters acétates dans la fermentation du vin par trois différentes levures. Ils ont

découvert que la formation des esters se trouvait affectée par la souche de levure utilisée, mais que les quantités d'esters individuels formés n'étaient pas affectées d'une manière égale par une levure spécifique. Les auteurs en ont conclu que plus d'un seul enzyme était impliqué dans la formation des esters, et que la formation des esters acétates dépendait aussi de l'espèce de raisin utilisé.

### *Composition des acides gras volatils*

La quantité totale des acides volatils varie considérablement dans différentes boissons. A l'exception du whisky Bourbon, qui en contient quatre fois autant, le niveau usuel des acides volatils dans le whisky est de 90-140 mg/l, alors que le brandy et le rhum en contiennent beaucoup plus. Le contenu en acide du rhum de la Martinique peut atteindre 600 mg/l (Nykänen *et al.*, 1968 *a*).

La proportion d'acide acétique dans la quantité totale des acides volatils est très élevée. Dans le whisky écossais, l'acide acétique représente la moitié du total des acides volatils ; dans les autres variétés de whisky, la proportion était encore plus grande : 60-95 p. 100. Dans le cognac, la proportion d'acide acétique correspondait à celle du whisky écossais, alors que l'acide acétique contenu dans le brandy

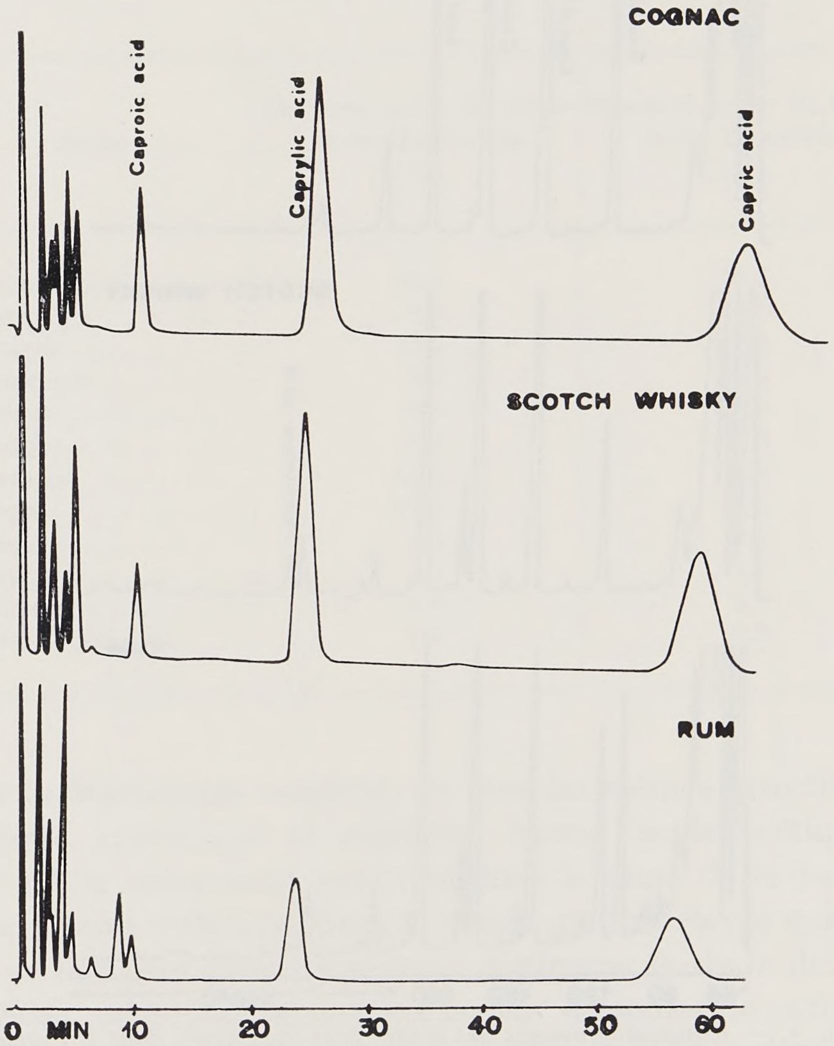



Fig. 4. — *Chromatogrammes en phase gazeuse des acides gras dans le cognac, le whisky écossais et le rhum*
(Nykänen *et al.*, 1968 *a*)

*Gas chromatograms of fatty acids in cognac, Scotch whisky and rum*
(Nykanen *et al.*, 1968 *a*)

atteignait jusqu'à 75 p. 100 du total des acides. Dans le rhum, les proportions correspondantes étaient de 75-85 p. 100.

Nous n'irons pas plus loin dans notre étude de l'acide acétique ; nous ne considèrerons, dans ce qui suit, que les acides supérieurs. La composition d'acides gras volatils du cognac, du whisky écossais et du rhum de la Martinique est présentée dans la figure 4.

Dans ces chromatogrammes, les acides volatils ont été analysés comme des acides libres. Les pics aigus au début du chromatogramme représentent les acides gras de chaîne courte, de l'acide acétique à l'acide isovalérique, suivis des acides caproïque, caprylique et caprique. Les mêmes acides gras, dans les mêmes proportions relatives apparaissent dans le cognac, le whisky et le rhum, bien que la matière première de base soit différente pour chacun de ces spiritueux-raisin pour le cognac, grain pour le whisky et sucre de cane pour le rhum. La similarité de la composition en acides de ces trois boissons devient encore plus évidente dans la figure 5, dans laquelle les acides gras volatils ont été déterminés sous forme de leurs esters méthyliques. L'une des caractéristiques des boissons distillées est le fait que les acides gras

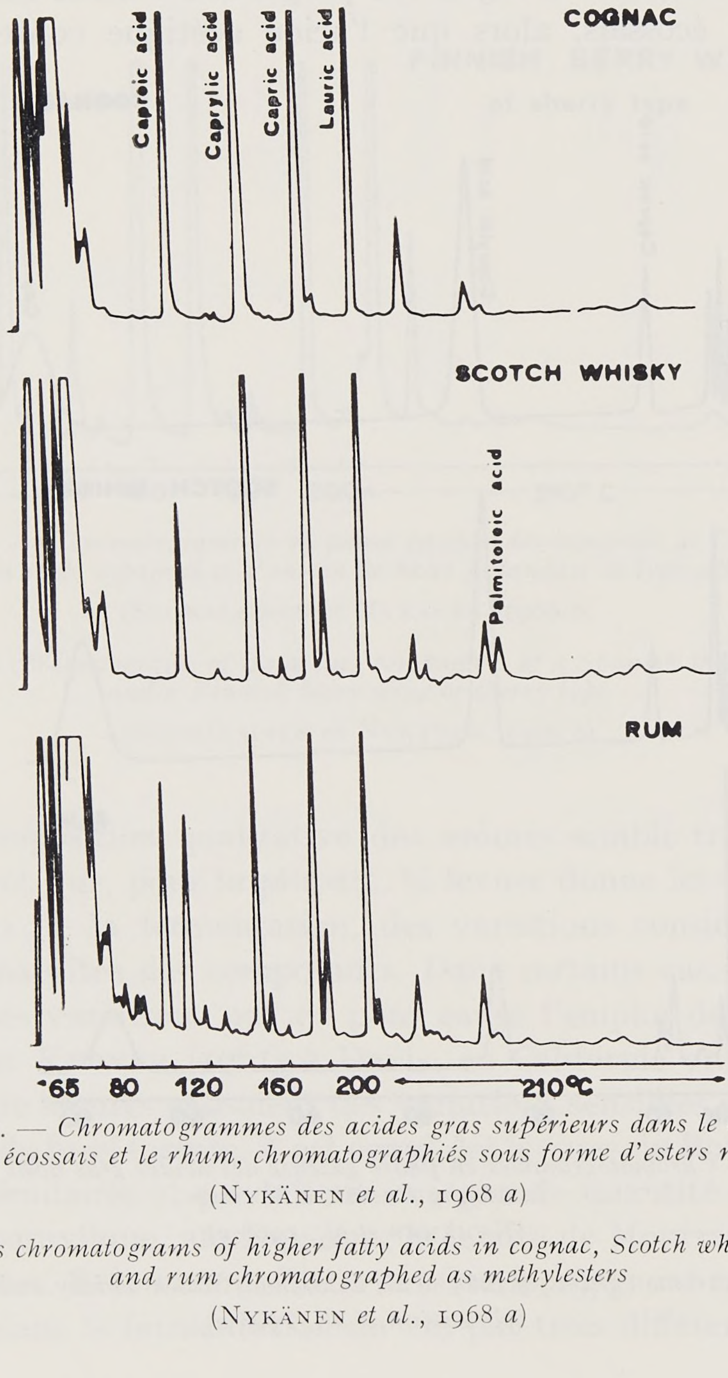



Fig. 5. — *Chromatogrammes des acides gras supérieurs dans le cognac, le whisky écossais et le rhum, chromatographiés sous forme d'esters méthyliques*

(Nykänen *et al.*, 1968 *a*)

*Gas chromatograms of higher fatty acids in cognac, Scotch whisky and rum chromatographed as methylesters*

(Nykänen *et al.*, 1968 *a*)

supérieurs, jusqu'à l'acide laurique même, sont nettement les constituants dominants de la composition en acides gras. De plus, les acides sont pour la plupart saturés et possèdent un nombre pair d'atomes de carbone. L'acide palmitoléïque est le seul acide gras insaturé important, et il apparaît presque uniquement dans le whisky écossais.

La composition essentielle en acides volatils des rhums de la Martinique et de la Jamaïque est indiquée dans le tableau 1. Comme on le remarquera, il existe quelques différences entre la composition en acides du rhum et celle du whisky et du brandy. On voit que les acides inférieurs, particulièrement l'acide propionique et l'acide butyrique, existent en plus grandes quantités dans le rhum. Cette proportion plus élevée réduit la quantité relative des acides caprylique et caprique, si bien qu'il est impossible de donner une définition certaine du composant principal dans le rhum, comme on peut le faire pour le whisky et le brandy.

TABLEAU I

*Quantités relatives des principaux acides gras volatils, sauf acide acétique, dans les fractions acides des rhums de la Martinique et de la Jamaïque*

(NYKÄNEN *et al.*, 1968 *a*)

| Acide | Fraction acide du rhum de la Martinique (%) | Fraction acide du rhum de la Jamaïque (%) |
|---|---|---|
| Propionique | 15,7 | 30,2 |
| Isobutyrique | 3,6 | 4,3 |
| Butyrique | 15,3 | 8,0 |
| Isovalérique | 4,7 | 6,5 |
| Valérique | 6,5 | 1,8 |
| Caproïque | 5,4 | 6,6 |
| Caprylique | 14,5 | 8,9 |
| Caprique | 17,5 | 16,6 |
| Laurique | 6,5 | 9,0 |
| Myristique | 1,1 | 1,7 |
| Palmitique | 4,0 | 2,9 |
| Palmitoléïque | 1,0 | 0,9 |

Le rhum de la Martinique contient, en gros les mêmes quantités d'acides propionique, butyrique, caprylique et caprique. Après l'acide acétique, c'est l'acide propionique qui est le composant principal dans le rhum de la Jamaïque. La proportion moyenne d'acide valérique dans le rhum est plus élevée que dans le whisky et le brandy, et ce fait peut être utilisé pour distinguer le rhum des autres boissons distillées. Les acides, possédant le nombre impair d'atomes de carbone, plus élevés que l'acide valérique n'apparaissent qu'en faibles quantités dans le rhum et les autres boissons. Les acides laurique, palmitique et myristique sont, quantitativement parlant, des constituants importants du rhum. Certains acides gras insaturés, tels que les acides palmitoléïque, oléïque et linoléïque, ont aussi été découverts dans les rhums de la Martinique et de la Jamaïque.

La façon dont l'espèce de levure influe sur la composition en acides gras d'une boisson, et donc aussi sur la composition en esters, n'est pas encore connue en détails. Toutefois, les chromatogrammes des acides gras des phases aérobiques et semi-aérobiques de la levure de boulanger et de la levure basse de bière montrent clairement que la composition des acides gras dans les différentes levures peut varier considérablement (fig. 6). A cet égard la levure de boulanger est nettement différente de la levure de bière, contenant une beaucoup plus grande quantité d'acides gras insaturés, oléïque et palmitoléïque, et une moindre quantité d'acides gras inférieurs (SUOMALAINEN, 1968 ; SUOMALAINEN et KERÄNEN, 1968). Au cours de la fermentation, les acides gras peuvent passer de la cellule de levure dans le milieu environnant, si bien que ces mêmes acides gras sont aussi présents dans le milieu de fermentation. Les résultats peuvent être complètement différents, si différentes levures, et encore plus s'il s'agit de bactéries, prenant part à la fermentation.

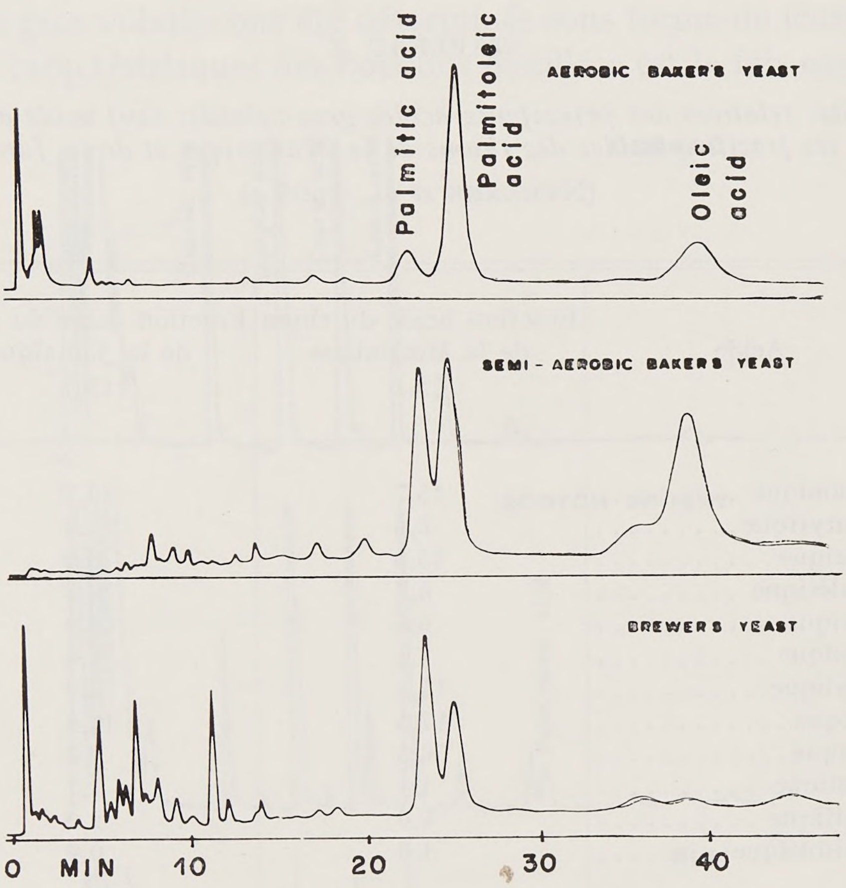



FIG. 6. — *Composition des acides gras des levures de boulanger et la bière* (SUOMALAINEN, 1969)

*Fatty acid composition of baker's and brewer's yeasts* (SUOMALAINEN, 1969)

## *Les alcools de fusel comme composés de l'arôme dans les boissons*

Dans les boissons distillées, les alcools de fusel représentent quantitativement le groupe le plus important parmi les composés de l'arôme. En moyenne, le rhum contient 0,6 g d'alcools de fusel par litre, le whisky écossais 1 g par litre, et le cognac environ 1,5 g par litre. Les proportions des alcools de fusel les plus importants dans le rhum et le whisky sont présentés dans le tableau 2.

Dans ce tableau, les valeurs indiquent que le gros de l'huile de fusel est de

TABLEAU 2

*Proportions des plus importants composés d'huile de fusel dans certains rhums et whiskies*
(SIHTO *et al.*, 1962)

| Boisson | Alcool isoamylique (%) | Alcool amylique opt. act. (%) | Alcool *n*-butylique (%) | Alcool isobutylique (%) | Alcool *n*-propylique (%) | Alcool *sec*-butylique (%) |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Rhum de la Jamaïque | 54 | 10 | 1 | 15 | 15 | 5 |
| Rhum de la Martinique I | 67 | 12 | + | 15 | 6 | + |
| Rhum de la Martinique II | 59 | 12 | 1 | 17 | 11 | + |
| Whisky écossais | 42 | 15 | + | 37 | 6 | 0 |
| Whisky d'Europe centrale | 59 | 16 | 0 | 20 | 5 | 0 |
| Whisky de seigle | 64 | 12 | 0 | 14 | 10 | 0 |

l'alcool isoamylique (SIHTO *et al.*, 1962) et que l'alcool isobutylique, l'alcool amylique opt. act. et l'alcool *n*-propylique apportent aussi une contribution substantielle. La composition de l'huile de fusel dans le rhum de la Jamaïque (fig. 7) est exceptionnelle. Elle contient des quantités considérables d'alcool *sec*-butylique, et même presque autant d'alcool *n*-propylique que d'alcool isobutylique. On a aussi découvert de l'alcool *sec*-butylique dans les alcools de fusel des vins et des brandies de fruits. La proportion d'alcool isoamylique par rapport à l'alcool amylique opt. act. est

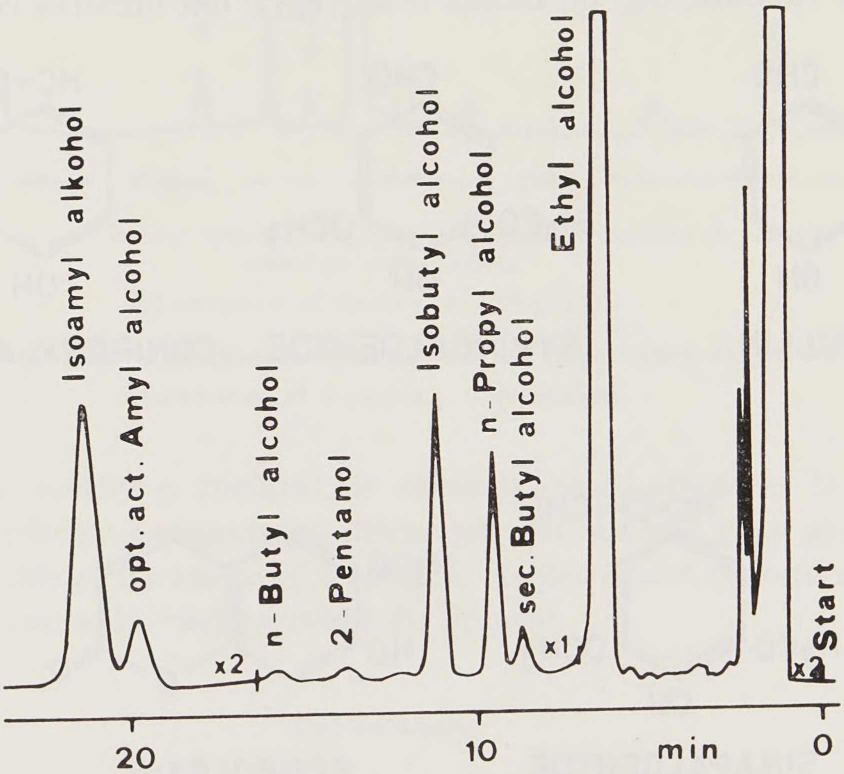



FIG. 7. — *Chromatogramme en phase gazeuse des alcools de fusel dans le rhum de la Jamaïque*
(NYKÄNEN *et al.*, 1968 *b*)

*Gas chromatogram of the fusel alcohols in Jamaican rum*
(NYKÄNEN *et al.*, 1968 *b*)

sensiblement plus élevée dans le rhum que dans le whisky. Le chromatogramme de la figure 7 indique que, en plus des alcools mentionnés, le rhum contient de petites quantités de pentanol-2 et d'alcool *n*-butylique.

### *Les composés phénoliques*

En plus des composés de l'arôme formés durant la fermentation et examinés plus haut, les boissons distillées telles que le whisky, le cognac et le rhum, contiennent également de petites quantités de composés phénoliques. Peu de choses ont été publiées au cours des dernières années sur la composition de la fraction phénolique du rhum. MAARSE et ten NOEVER de BRAUW (1966) ont étudié les composés phénoliques du rhum de la Jamaïque et réussi à identifier les phénols eugénol et méthyl-4 gaïacol. TIMMER *et al.* (1971) ont isolé les composés phénoliques du rhum de la Jamaïque et, en utilisant la chromatographie en phase gazeuse et la spectrométrie de masse couplées, la spectrométrie infrarouge et la chromatographie sur couche mince ils ont identifié quelques phénols correspondant à ceux découverts par NISHIMURA et MASUDA (1971) dans les whiskies écossais et japonais.

Des acides et des aldéhydes phénoliques ont été identifiés dans le cognac et le whisky conservés plusieurs années dans des barriques de chêne. On a supposé que ces composés ont été formés par l'alcoolyse de la lignine du bois (OTSUKA *et al.*, 1965). Il semble donc évident qu'ils se trouvent également dans le rhum conservé de la même façon.

L'extraction des composés phénoliques à partir du bois pendant le vieillissement des boissons semble être mieux connue que leur formation pendant la distillation. BALDWIN *et al.* (1967) ont identifié quelques aldéhydes phénoliques dans le whisky, par exemple la vanilline (fig. 8). BLACK *et al.* (1953) ont identifié ces aldéhydes dans

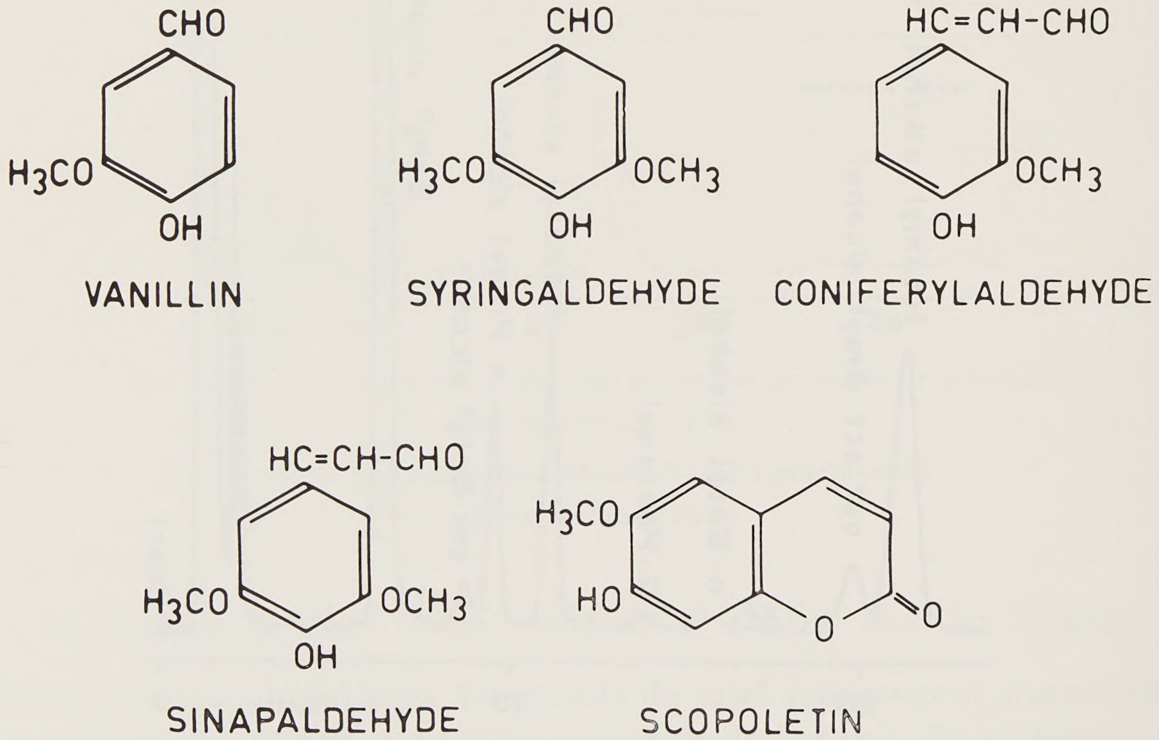



FIG. 8. — *Quelques-uns des composés aromatiques identifiés dans le whisky* (BALDWIN *et al.*, 1967)

*Some aromatic compounds identified in whisky* (BALDWIN *et al.*, 1967)

des extraits d'alcool de chêne blanc des États-Unis, naturel et carbonisé. Grâce aux méthodes d'analyse modernes, le nombre des composés phénoliques, et même le nombre d'autres substances de l'arôme, augmente rapidement. Les Japonais NISHIMURA et MASUDA (1971) ont identifié 14 composés phénoliques dans les fusels de whisky, l'eugénol étant le plus important constituant. Nous avons prêté une attention toute particulière aux composés phénoliques dans l'étude des changements survenus dans l'arôme du whisky au cours du vieillissement de celui-ci. Le chromatogramme de la figure 9 présente des phénols extraits de copeaux de chêne immergés dans l'alcool dans des expériences types. Selon ce chromatogramme, l'alcool peut extraire, du chêne utilisé pour faire des fûts de whisky écossais, le gaïacol, le phénol, le *m*-crésol, l'eugénol et la vanilline, dont l'eugénol est le principal constituant (LEHTONEN et NYKÄNEN, non publié).

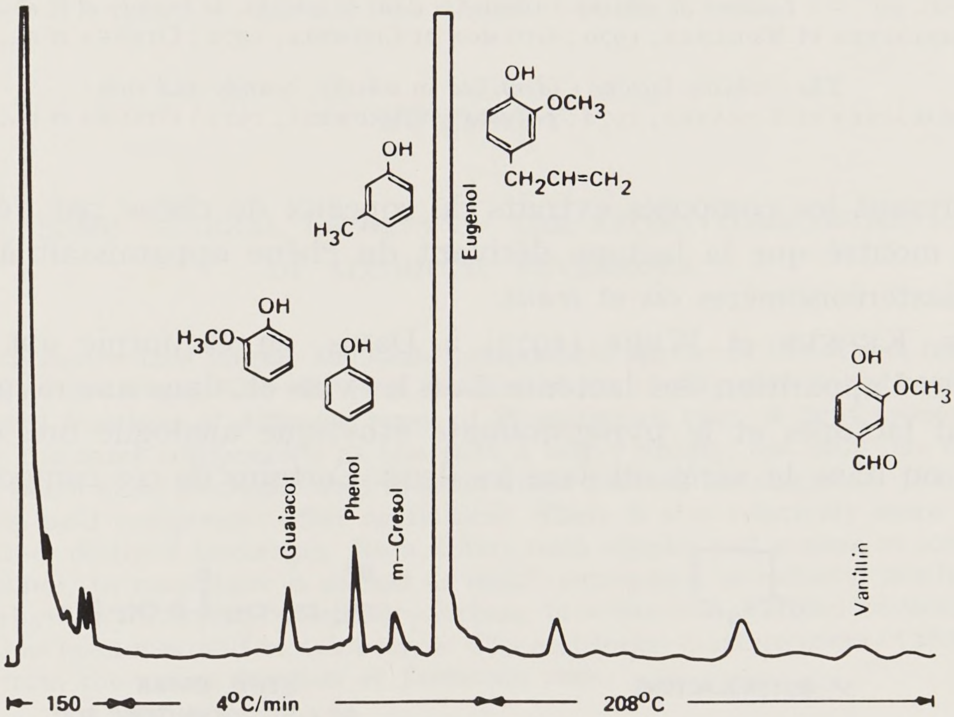



FIG. 9. — *Chromatogramme des phénols extraits de copeaux de chêne immergés dans l'alcool*
(LEHTONEN et NYKÄNEN, non publié)

*The chromatogram of the phenols extracted from oak chips immersed in alcohol*
(LEHTONEN et NYKÄNEN, unpublished)

Le furfural, le méthyl-5 furfural, le succinate diéthylique et le γ-lactone de l'acide méthyl-3-hydroxy-4-caprylique devraient être ajoutés à ce groupe de composés extraits du chêne, GUYMON et CROWELL (1972) ayant découvert qu'ils dérivent du chêne au cours du vieillissement du brandy.

## *Les lactones*

Il est intéressant de noter que la présence de la prétendue « lactone de whisky » (fig. 10), la γ-lactone de l'acide méthyl-3-hydroxy-4-caprylique, dans les vins et les boissons distillées implique que ceux-ci ont vieilli dans des barriques de chêne. Il y a quelques années, nous avons isolé cette lactone à partir du whisky écossais, et nous l'avons identifiée par IR et par la spectrométrie de masse (SUOMALANIEN

## RESUMEN


### ALGUNOS ASPECTOS GENERALES DE LA COMPOSICIÓN DEL AROMA DE LAS BEBIDAS ALCOHÓLICAS

De forma inesperada — y para una gran parte — los mismos compuestos aparecen en las fracciones volátiles del aroma de la cerveza, del vino y de ciertas bebidas destiladas, como, por ejemplo, el whisky, el brandy y el ron. El propio procedimiento de destilación ejerce a su vez, cierta influencia respecto al aroma de las bebidas destiladas. Una comparación de la composición del aroma de dos rons de las Antillas demuestra que ambos son cualitativamente semejantes, aun cuando presentan diferencias cuantitativas bastante apreciables. Existen algunas diferencias entre la composición en ácidos del ron y la del whisky y del brandy. Se observa así que los ácidos inferiores, y en particular el ácido propiónico y el ácido butírico, existen en el ron en cantidades superiores. Después del ácido acético, el ácido propiónico es el componente principal cuando se trata del ron de Jamaica. La proporción media de ácido valérico en el ron es más elevada que en el whisky y el brandy, hecho que puede ser aprovechado para establecer la distinción existente entre el ron y las demás bebidas destiladas. La composición del aceite de fusel en el ron de la Jamaica es excepcional., ya que contiene cantidades considerables de alcohol seco-butílico, e incluso, casi tanto alcohol n-propílico como de alcohol isobutílico. La presencia de la pretendida « lactona del whisky », la γ-lactona del ácido metil-3-hidroxi-4-caprílico en los vinos y bebidas destiladas, presupone que el añejamiento de los mismos ha tenido lugar en barricas de roble.


## RIASSUNTO


### ALCUNI ASPETTI GENERALI DELLA COMPOSIZIONE DELL'AROMA DELLE BEVANDE ALCOOLICHE

In modo inatteso per una gran parte, gli stessi composti appaiono nelle frazioni volatili dell'aroma della birra, del vino e delle bevande distillate quali il whisky, il cognac e il rum. Il procedimento stesso di distillazione ha un' influenza sull'aroma delle bevande distillate. Un confronto della composizione dell'aroma di due diversi tipi di rum delle Antille mostra che essi sono simili dal punto di vista qualitativo mentre dal punto di vista quantitativo, presentano delle differenze sensibili. Esistono alcune differenze tra la composizione di acidi del rum e quella del whisky e del brandy. Si nota che gli acidi inferiori, particolarmente l'acido propionico e l'acido butirrico, esistono in quantità più elevate nel rum. Dopo l'acido acetico, à l'acido propionico che è il componente principale nel rum della Giamaica. La proporzione media di acido valerico nel rum è più elevata rispetto al whisky e al brandy e questo criterio puo' essere utilizzato per distinguere il rum dalle altre bevande distillate. La composizione dell'olio di flemma nel rum della Giamaica è eccezionale. Essa contiene considerevoli quantità d'alcool secco-butilico e quasi tanto alcool n-propilico quanto alcool isobutilico. La presenza del supposto « lattone di whisky », dell' γ-lattone dell'acido metil-3-idrossi-4-caprilico nei vini e nelle bevande distillate significa che esse sono state lasciate invecchiare in botti di quercia.


## RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES


BALDWIN S., BLACK R. A., ANDREASEN A. A., ADAMS S. L., 1967. Aromatic congener formation in maturation of alcoholic distillates. *J. agric. Food Chem.*, **15**, 381-385.

BLACK R. A., ROSEN A. A., ADAMS S. L., 1953. The chromatographic separation of hardwood extractive components giving color reactions with phloroglucinol. *J. Am. chem. Soc.*, **75**, 5344-5346.

DAUDT C. E., OUGH C. S., 1973. Variations in some volatile acetate esters formed during grape juice fermentation. Effects of fermentation temperature, $SO_2$, yeast strain, and grape variety. *Am. J. Enol. Vitic.*, **24**, 130-135.

DRAWERT F., RAPP A., 1966. Über Inhaltsstoffe von Mosten und Weinen. VII. Gaschromatographische Untersuchung der Aromastoffe des Weines und ihrer Biogenese. *Vitis,* **5**, 351-376.

GUYMON J. F., CROWELL E. A., 1972. GC-separated brandy components derived from French and American oaks. *Am. J. Enol. Vitic.*, **23**, 114-120.

LAWRENCE W. C., 1964. Volatile compounds affecting beer flavor. *Wallerstein Lab. Commun.*, **27**, 123-152.

LEHTONEN M., NYKÄNEN L., *unpublished.*

MAARSE H., ten NOEVER de BRAUW M. C., 1966. The analysis of volatile components of Jamaica rum. *J. Food Sci.*, **31**, 951-955.

MULLER C. J., KEPNER R. E., WEBB A. D., 1973. Lactones in wines, a review. *Am.J. Enol. Vitic.*, **24**, 5-9.

NISHIMURA K., MASUDA M., 1971. Minor constituents of whisky fusel oils. 1. Basic, phenol and lactonic compounds. *J. Food Sci.*, **36**, 819-822.

NORDSTRÖM K., 1961. Formation of ethyl acetate in fermentation with brewer's yeast. *J. Inst. Brew.*, **67**, 173-181.

NORDSTRÖM K., 1964. Studies on the formation of volatile esters in fermentation with brewer's yeast. *Svensk kem. Tidskr.*, **76**, 510-543.

NYKÄNEN L., PUPUTTI E., SUOMALAINEN H., 1968 *a*. Volatile fatty acids in some brands of whisky, cognac and rum. *J. Food Sci.*, **33**, 88-92.

NYKÄNEN L., PUPUTTI E., SUOMALAINEN H., 1968 *b*. Composition of the aroma in some brands of whisky and rum analysed by customary methods and by gas chromatography. *Kem. Teollisuus*, **25**, 399-404.

OTSUKA K., IMAI S., MORINAGA K., 1965. Studies on the mechanism of aging of distilled liquors. Part II. Distribution of phenolic compounds in aged distilled liquors. *Agric. biol. Chem.*, **29**, 27-31.

OTSUKA K., ZENIBAYASHI Y., ITOH M., TOTSUKA A., 1974. Presence and significance of two diastereomers of β-methyl-γ-octalactone in aged distilled liquors. *Agric. biol. Chem.*, **38**, 485-490.

PARFAIT A., NAMORY M., DUBOIS P., 1972. Les esters éthyliques des acides gras supérieurs des rhums. *Ann. Technol. agric.*, **21**, 199-210.

RONKAINEN P., BRUMMER S., SUOMALAINEN H., 1970. Determination of 2-acetolactic acid and 2-aceto-2-hydroxybutyric acid in a fermented solution by gas chromatography. *Analyt. Biochem.*, **34**, 101-111.

ROSCULET G., 1970. Aroma and flavor of beer. I. Origin and characterization of volatile components of beer. *Brewers' Dig.*, **45**, 64-84.

SIHTO E., NYKÄNEN L., SUOMALAINEN H., 1962. Gas chromatography of the aroma compounds of alcoholic beverages. *Teknill. Kem. Aikak.*, **19**, 753-762.

SUOMALAINEN H., 1968. The structure and function of the yeast cell. In *Aspects of Yeast Metabolism* a Guinness Symposium, Dublin 1965, ed. by A. K. MILLS and H. KREBS, 1-31. Blackwell Scientific Publications, Oxford-Edinburgh.

SUOMALAINEN H., 1969. Some aspects on the structure and function of the yeast cell. In *Yeasts.* The Proceedings of the 2nd Symposium on Yeasts, Bratislava 1966, 429-436, Vydavalelistvo Slovenskej Akademic vied Bratislava.

SUOMALAINEN H., KERÄNEN A. J. A., 1968. The fatty acid composition of baker's and brewer's yeast. *Chem. Phys. Lipids*, **2**, 296-315.

SUOMALAINEN H., LINNAHALME T., 1966. Metabolites of α-ketomonocarboxylic acids formed by dried baker's and brewer's yeast. *Arch. Biochem. Biophys.*, **114**, 502-513.

SUOMALAINEN H., NYKÄNEN L., 1966 *a*. The aroma components produced by yeast in nitrogen-free sugar solution. *J. Inst. Brew.*, **72**, 469-474.

SUOMALAINEN H., NYKÄNEN L., 1966 *b*. The aroma compounds produced by sherry yeast in grape and berry wines. *Acta chem. fenn.*, B **39**, 252-256.

SUOMALAINEN H., NYKÄNEN L., 1968. Methods applied in studies on the aroma composition of alcoholic beverages. *Wallerstein Lab. Commun.*, **31**, 5-15.

SUOMALAINEN H., NYKÄNEN L., 1970. Investigations on the aroma of alcoholic beverages. *Näringsmiddelindustrien*, **23**, 15-30.

SUOMALAINEN H., RONKAINEN P., 1963. Keto acids in baker's yeast and in fermentation solution. *J. Inst. Brew.*, **69**, 478-483.

SUOMALAINEN H., RONKAINEN P., 1968. Aroma components and their formation in beer. *Tech. Quart., Master Brewers Ass. Am.*, **5**, 119-127.

TIMMER R., ter HEIDE R., WOBBEN H. J., de VALOIS P. J., 1971. Phenolic compounds in rum. *J. Food Sci.*, **36**, 462-463.

WEBB D. A., INGRAHAM J. L., 1963. Fusel oil. *Adv. appl. Microbiol.*, **5**, 317-353.

WEBB D. A., KEPNER R. E., 1961. Fusel oil analysis by means of gas-liquid partition chromatography. *Am. J. Enol. Vitic.*, **12**, 51-59.

WEBB D. A., MULLER C. J., 1972. Volatile aroma components of wines and other fermented beverages. *Adv. appl. Microbiol.*, **15**, 75-146.

*Ann. Technol. agric.*, 1975, **24** (3-4), 469-495.

# PRODUCTION OF LIGHT-BODIED RUM BY AN EXTRACTIVE DISTILLATION PROCESS

E. D. UNGER, T. R. COFFEY

*J. E. Seagram and Sons, INC.*
*Research and Development Department,*
*Louisville, Kentucky (U. S. A.)*

## SUMMARY

Extractive distillation is a process for simultaneously separating heads and fusel oil from rum high wine by adding water to the top plate of a distilling column. These congeners are removed from the condenser while ethanol at 5-10 p. 100 by volume is removed from the base.

The amount of amyl, butyl and propyl alcohol removed by this operation is a function of 1) the volatility of the particular congener with respect to ethanol, 2) ethanol concentration at the base, 3) reflux ratio (L/V) in the stripping section, 4) the quantity of distillate removed from the condenser. The effect of these variables on percentage of congener removal is presented for a column consisting of 25 stripping and 10 concentrating plates.

By operating an extractive distillation column and a rectifying column in series, light-bodied rum can be produced at 189-190° proof. By means of computerized calculations of the performance characteristics of both of these columns, the fusel oil composition of the rum product can be predicted for any set of operating conditions.

The advantages and disadvantages of this process will be compared with those of a BARBET system in which fusel oil is removed by a fusel oil concentrating column.

## INTRODUCTION

The distilling industry owes a debt of gratitude to those technologists in Europe who, during the 19th and 20th centuries, contributed so much toward the development of the science and practice of distillation. Through the efforts of men like CELLIER-BLUMENTHAL, COFFEY, BARBET, GUILLAUME, SOREL, KIRSCHBAUM, HAUSBRAND, RICARD and GUINOT, processes were developed for distillation of fine quality neutral spirits (KIRK and OTHMER, 1963). Today these same techniques are used throughout the world for both beverage and industrial alcohol production.

*Separation of congeners from ethanol by distillation*

Ethyl alcohol produced by fermentation and distilled on a simple beer still (or analyzing column) contains small concentrations of many components or congeners which may contribute pleasant flavors to some products but which are undesirable in neutral spirits. In order to separate these constituents from ethanol, it is necessary to know how they behave in a distilling column. Their behavior can be classified into four groups as follows :

1) those whose boiling point is less than that of alcohol and can always be removed as heads constituents from the condenser of a distilling column ;
2) those which are soluble in water and whose boiling point is higher than that of water and can always be removed as tails (dregs) from the bottom of the column ;
3) those which are insoluble or only partially miscible with water but whose boiling point is greater than that of water ;
4) those which boil between water and alcohol.

It is these latter two groups of congeners (for example the higher boiling alcohols and esters) which are the most difficult to remove.

BARBET developed continuous distilling processes in which these particular congeners are concentrated and removed as a side draw-off (tails) from the mid-point of a column producing high proof spirits.

However, GUILLAUME (1911) and RICARD and GUINOT (1933) recognized that these constituents at low ethanol concentration behave like heads and can be separated together with the low-boiling aldehydes and esters as a draw-off stream from the condenser. This makes it possible to substantially purify the ethyl alcohol in a single column so that a second column is required only to raise the concentration to 95-97° G.L. (190-194° U.S. proof) in order to remove the remaining congeners and to produce a neutral spirit.

This behavior pattern is illustrated in figure 1 which shows the correlation between volatility of the higher boiling alcohols (fusel oils) and ethanol proof. At high ethanol concentration, they are less volatile than ethyl alcohol and will concentrate in a rectifying column at a plate where the ethanol concentration is 110-160° proof (depending upon the specific alcohol and reflux ratio). At low ethanol concentration (especially 20° proof or less) their volatility is greater than that of ethyl alcohol and they will behave as heads constituents. In figures 2, 3 and 4 the same correlation is shown : 1) for acids which are always less volatile than ethanol, 2) for various aldehydes and 3) for various esters.

*The Extractive distillation process*

The GUILLAUME principle of separating the low-boiling congeners together with the higher-boiling alcohols as heads by adding water to the top plate of the column and stripping the ethanol freed stream at low proof is now called extractive distillation.

For example, as shown in figure 5, the feed stream containing congeners is introduced into the column (plate 37) and boiling is induced either by injection of live

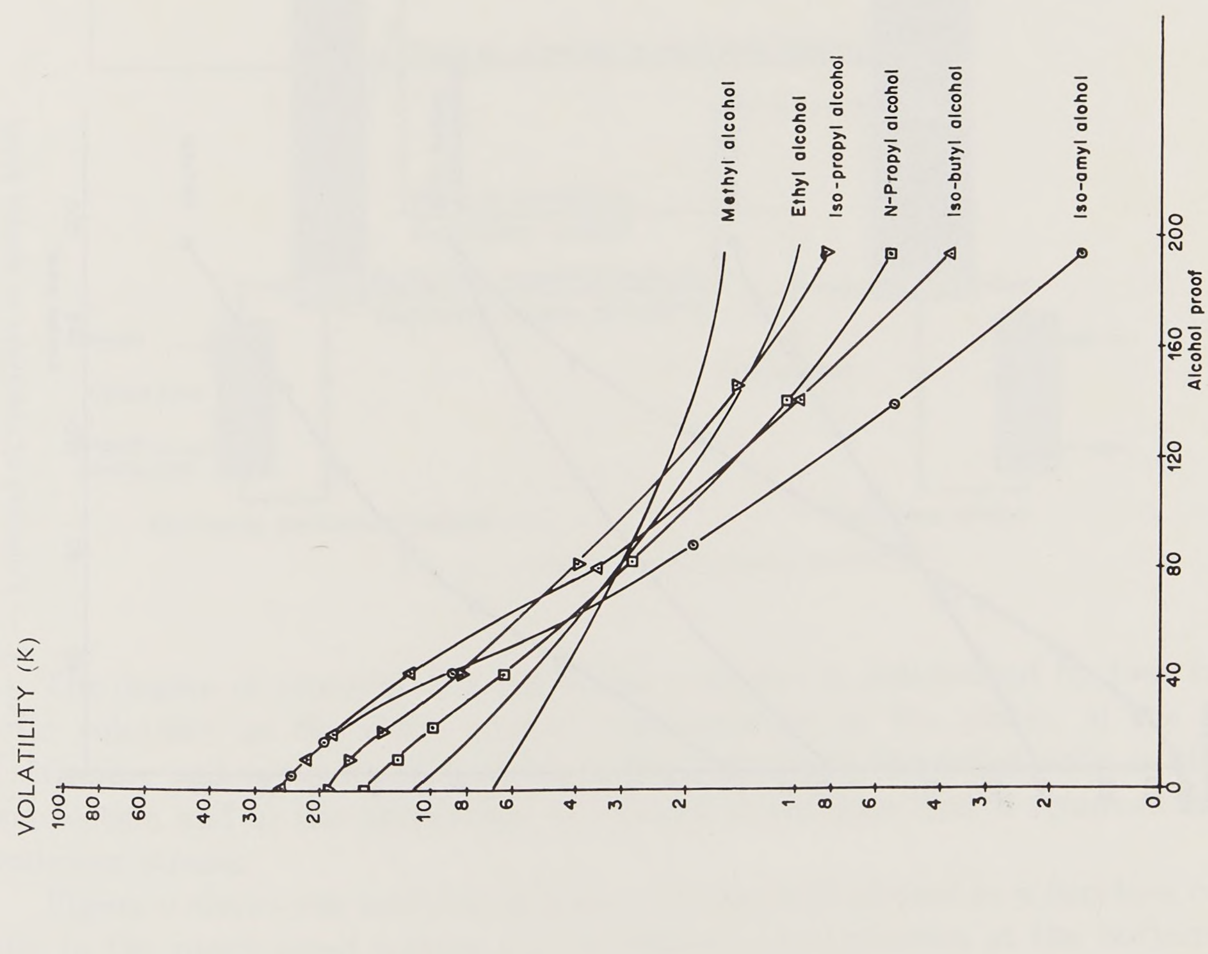



FIG. 1. — *Volatility of fused oils vs alcohol proof*

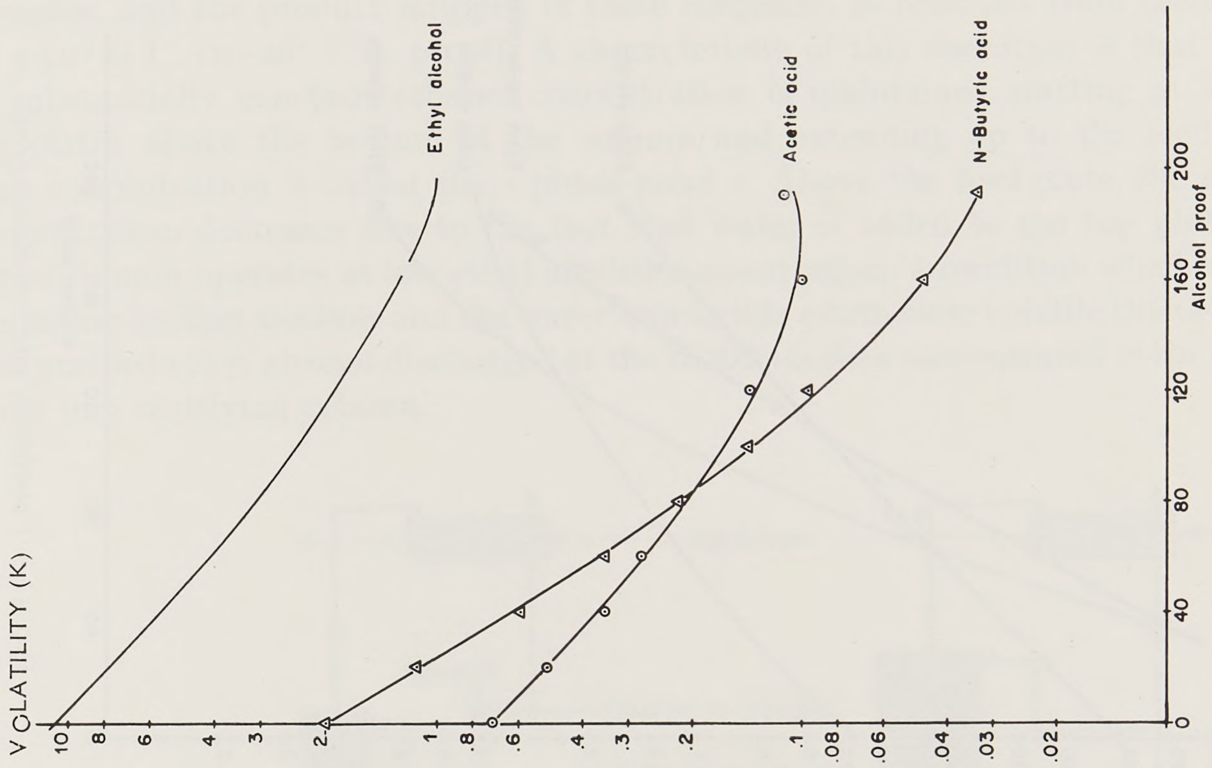



FIG. 2. — *Volatility of acids vs alcohol proof*

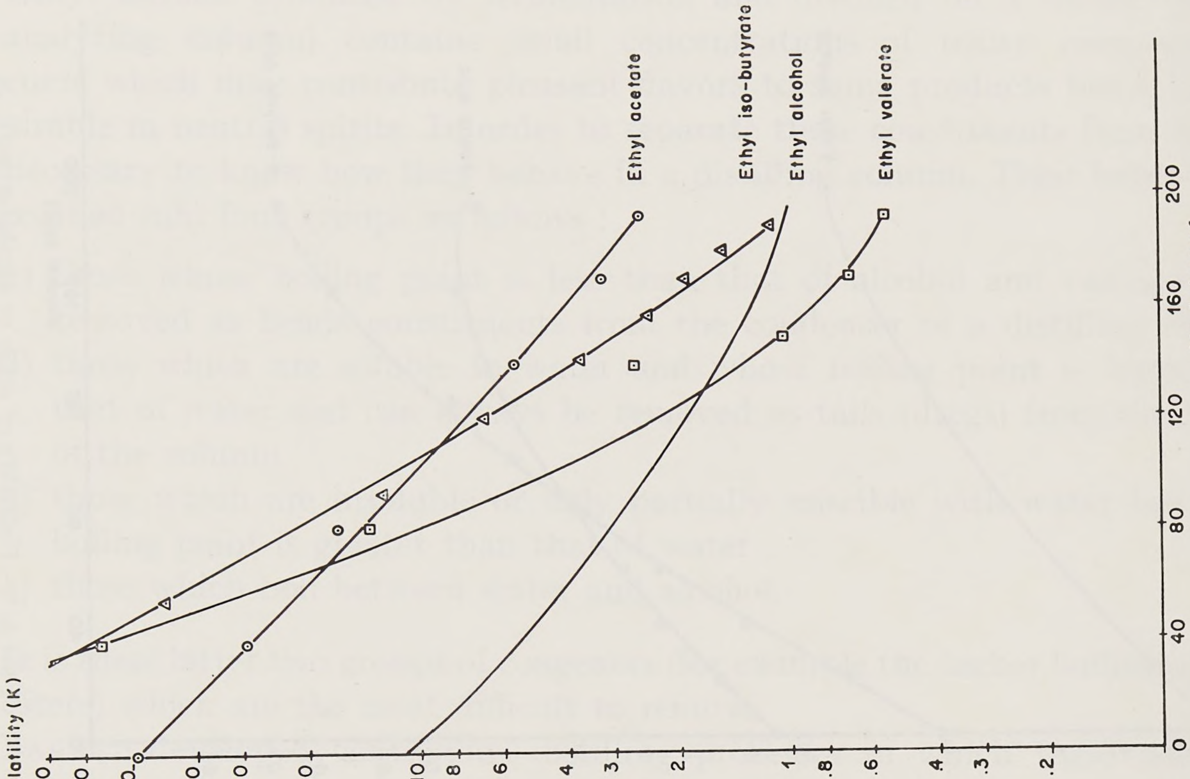



FIG. 4. — *Volatility of esters vs alcohol proof*

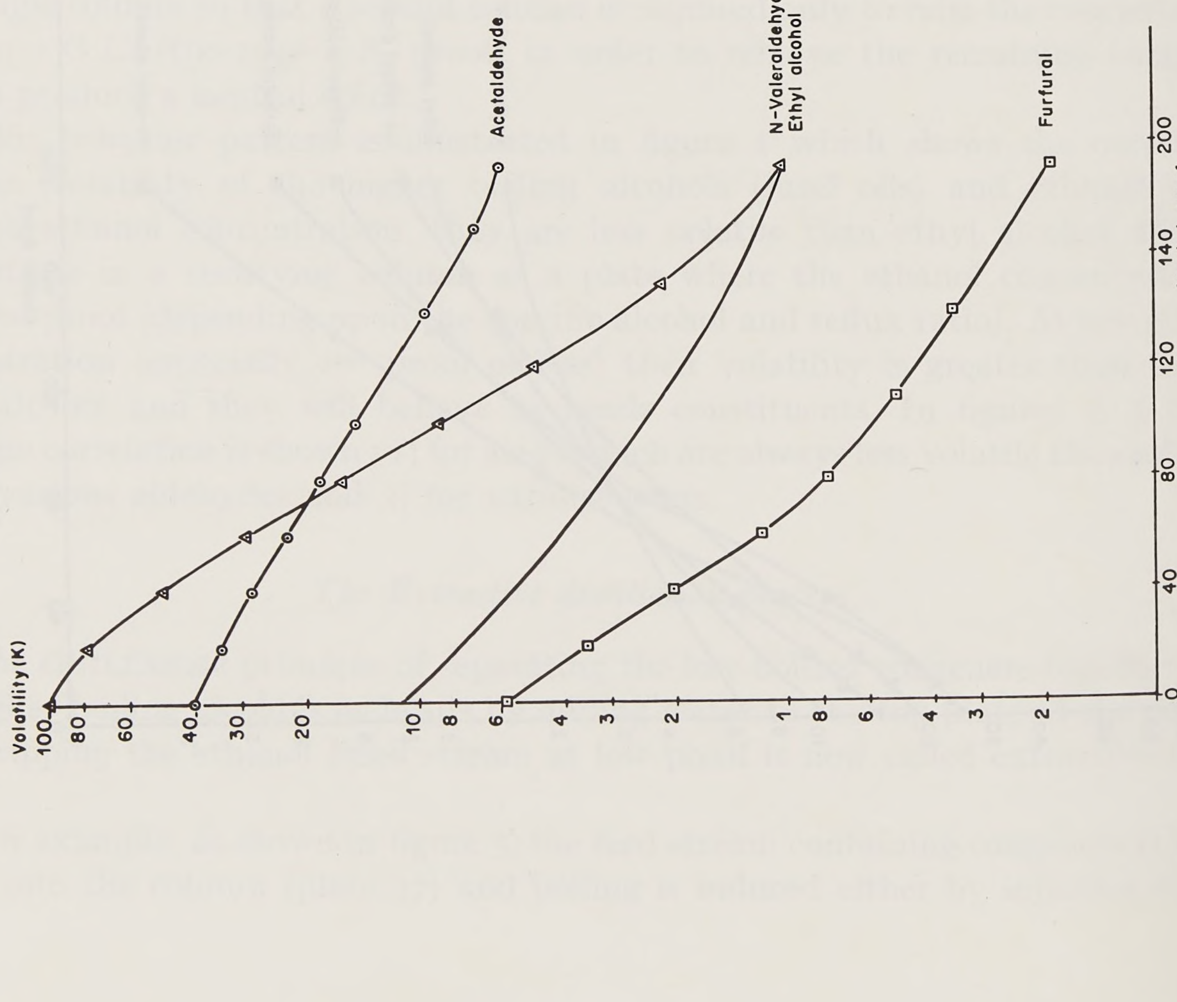



FIG. 3. — *Volatility of aldehydes vs alcohol proof*

steam at the bottom or by means of a steamheated reboiler (calandria). Water at its boiling point is fed to the top plate (50). Heads from the condenser, containing both low-boiling congeners (aldehydes, esters) and fusel oils are withdrawn from a decanter, and the product stripped of these congeners is removed from the bottom at 5-10° G.L. (10-20° U.S. proof). A characteristic of this operation is that a zone of substantially constant ethanol concentration is maintained starting at a point 3-5 plates above the bottom of the column and extending up to the feed plate. This concentration is called the « pinch-proof ». Above the feed plate, the ethanol concentration decreases due to the fact that water is added to the top plate. The entire column operates at low ethyl alcohol concentration, a condition which renders the higher-boiling alcohols and the water-immiscible esters more volatile than ethanol. The purified ethyl alcohol discharged at the bottom is then concentrated to the desired proof in a rectifying column.

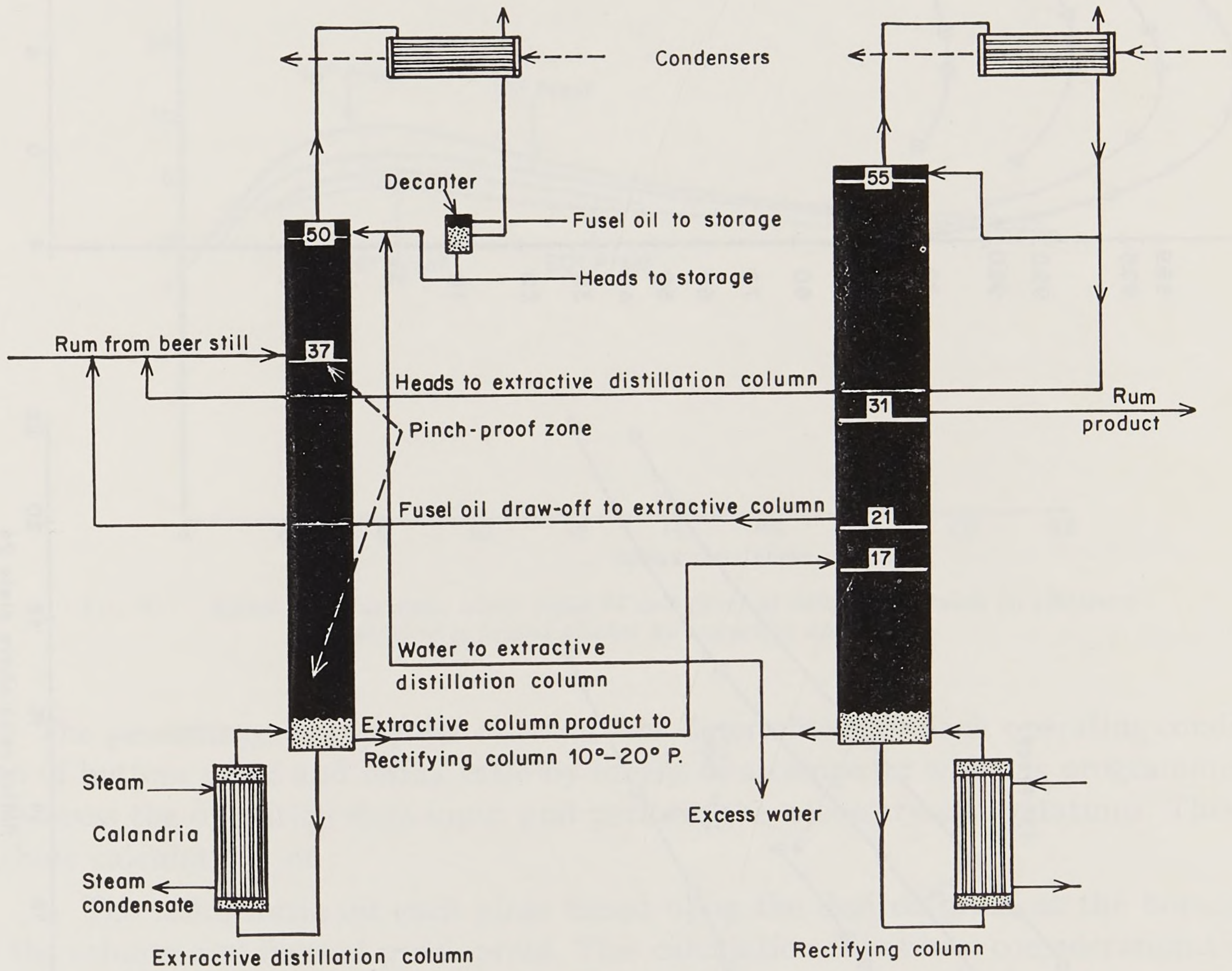



FIG. 5. — *Extractive distillation process*

The degree of removal of a particular congener is determined by four factors : 1) its volatility at the ethyl alcohol concentration on the plates, 2) the number of stripping and concentrating plates in the column, 3) the reflux ratio in the stripping section and 4) the percentage of ethanol in the feed that is removed from the condenser stream.

Figure 6 shows the removal efficiency of *iso*-amyl alcohol as a function of reflux ratio in the pinch-proof section and of ethanol concentration at the bottom of the

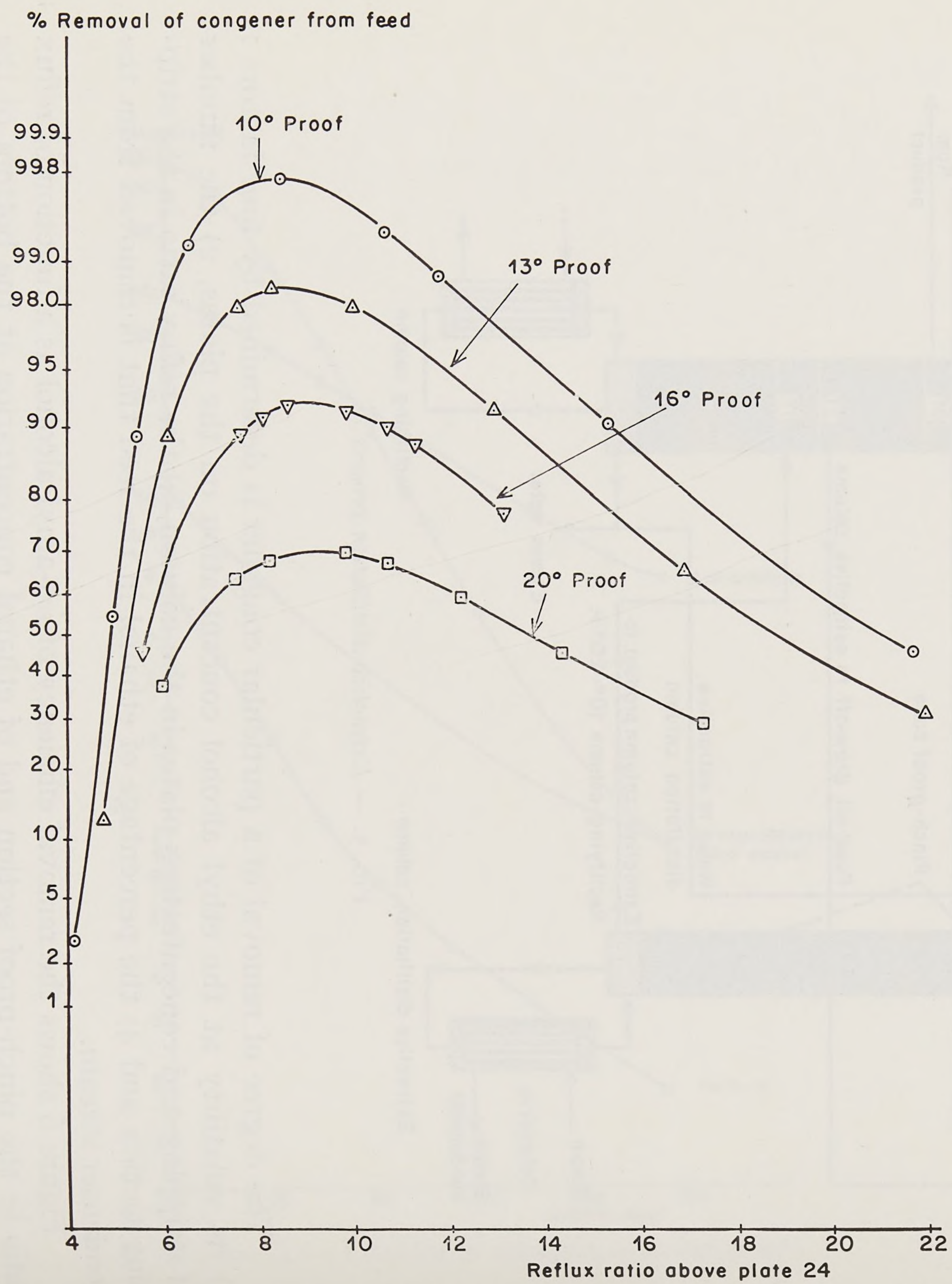



FIG. 6. — *Effect of reflux ratio above plate 24 and proof at bottom of column on efficiency of removal of iso-amyl alcohol by extractive distillation*

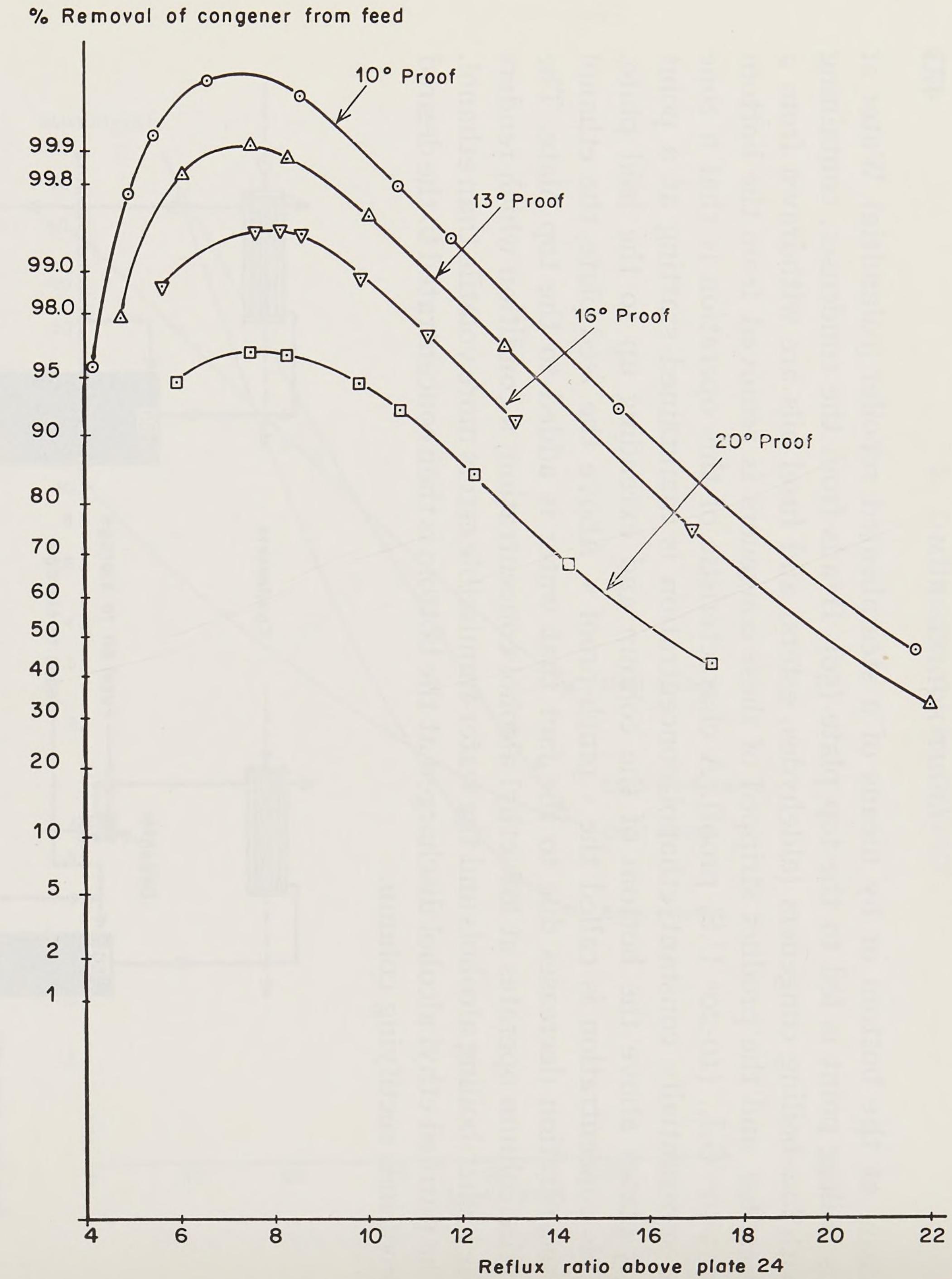



FIG. 7. — *Effect of reflux ratio above plate 24 and proof at bottom of column on efficiency of removal of iso-butyl alcohol by extractive distillatiol*

column. These values apply to a column heated by live steam and consisting of 25 stripping and 10 concentrating plates in which 1 p. 100 of the ethanol in the feed stream is removed from the condenser together with the higher-boiling alcohols. The efficiency of *iso*-amyl alcohol removal is a function of ethyl alcohol concentration at the bottom of the column, and increases as ethanol concentration decreases. In addition, an optimum reflux ratio exists for maximum removal. Figure 7 shows the same relationship for isobutyl alcohol removal. This process can achieve a high percentage of removal of these two congeners but in the case of *n*-propyl alcohol (fig. 8) removal is poor under all operating conditions. This is due to the fact that, even at low ethanol concentration, this congener has a volatility only slightly higher than that of ethyl alcohol.

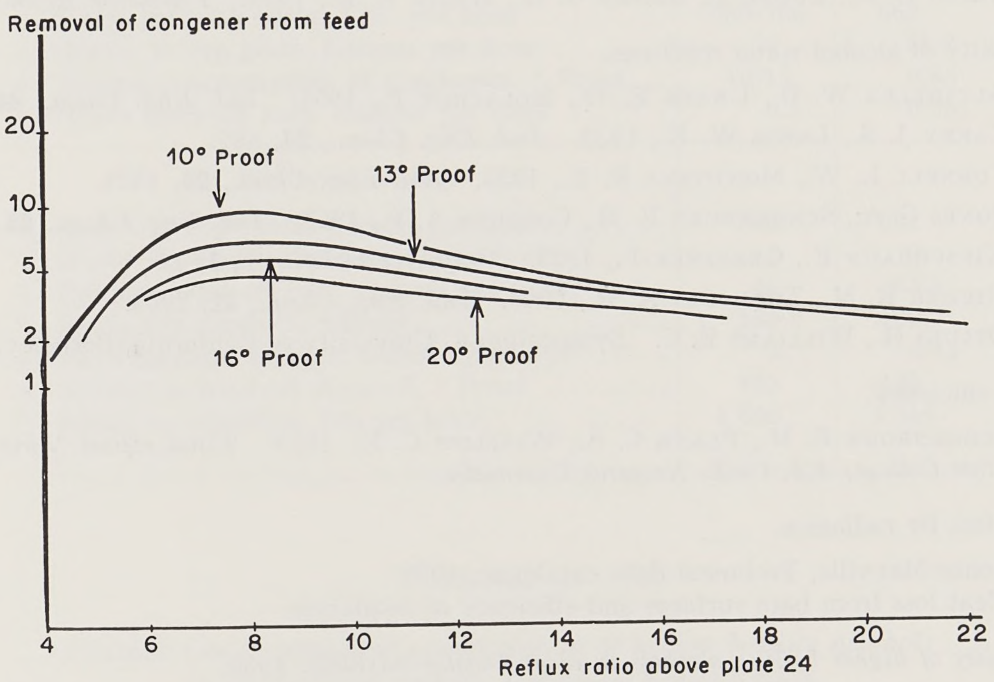



FIG. 8. — *Effect of reflux ratio above plate 24 and proof at bottom of column on efficiency of removal of* n-*propyl alcohol by extractive distillation*

The percentage of congener removal was determined for each operating condition of bottom proof and reflux ratio by means of a computer which is programmed to process the operating data input and perform the necessary computations. These include calculations of :

1. The reflux ratio on each plate based upon the desired proof at the bottom of the column and desired pinch-proof. This calculation takes into consideration the enthalpy (heat content) of liquid and vapor flowing into and out of each plate and corrects for the effects of operating pressure and heat radiation loss from each plate.

2. The volatility of both ethyl alcohol and congeners as a function of liquid proof on each plate. This calculation takes into consideration the plate efficiency which is dependent upon ethanol concentration in the liquid phase.

For the total column and for each plate a balance exists so that : 1) heat in equals heat out and, 2) ethanol, water and congener in equals ethanol, water and congener out.

The physical data used for these calculations were obtained from the sources

shown in table I and are stored in the computer program in the form of hyperbolic equations. A similar computer program has been developed for predicting the performance of a rectifying column and also for other distillation processes which we employ.

TABLE I

*Souce of data used in Computer program for extractive distillation*

A. Enthalpy of alcohol-water liquid mixtures.
B. Enthalpy of alcohol-water vapor mixtures.
C. Boiling temperature of alcohol-water mixtures.

Smith D. A., Luong J., Brown G. G., White R. R., 1945. *Petroleum Refiner*, **24**, 296.

D. Volatility of alcohol-water mixtures.

Altsheler W. B., Unger E. D., Kolachov P., 1954. *Ind. Eng. Chem.*, **43**, 2559.
Carey J. S., Lewis W. K., 1932. *Ind. Eng. Chem.*, **24**, 882.
Cornell L. W., Montonna R. E., 1933. *Ind. Eng. Chem.*, **24**, 1331.
Jones C. A., Schoenburn E. M., Colburn A. P., 1943. *Ind. Eng. Chem.*, **35**, 666.
Kirschbaun E., Gerstner F., 1939. *Verfahrenstechnik* Z., **1**, 10.
Rieder R. M., Thompson A. R., 1949. *Ind. Eng. Chem.*, **41**, 2905.
Otsuki H., Williams E. C. Symposium 6, University of California, Berkeley, Cal.

E. Plate efficiency.

Schoenborn E. M., Plank C. A., Winslow C. E., 1959. *Final report North Carolina State College, A.I. Ch.E. Research Committee.*

F. Heat loss by radiation.

Johns-Manville, Technical data catalogue, 1939.
Heat loss from bare surfaces and efficiency of insulation.

G. *Volatility of higher boiling alcohols in alcohol-water mixtures*, 1950.

Dodge W. B., Thesis, University of Louisville.

## *Production of light-bodied rum in Hawaii by extractive distillation and rectification*

This extractive distillation and rectification process was employed at our distillery in Hawaii to produce rum intermediate in flavor intensity between a neutral product such as cane spirits and a heavy-bodied (flavorful) rum produced by distillation on a single column beer still only. In order to meet United States requirements, the product must be distilled at a proof less than 190° U.S. proof (95° G.L.) and must have the taste and aroma characteristics of rum.

The operating data and the corresponding computed values are shown in table 2. The close agreement between measured and computed values demonstrate the validity and value of the use of a computer for predicting the performance of proposed operating procedures or in re-producing existing operations. We now use this technique for both purposes in our distillery operations.

In table 3, a comparison is made between the measured and computed concentrations of the higher boiling alcohols in the rum product based upon the analysis of the rum fed to this distillation system. Since heads from the rectifying column and

TABLE 2

*Production of light-bodied rum by extractive distillation and rectification*

| | Measured values | Computed values |
|---|---|---|
| *Extractive distillation column* | | |
| 1. Feed to column. Gallons per hour | 85 | 85.15 |
| 2. Alcohol concentration in feed. ° Proof | 160 | 159.98 |
| 3. Alcohol concentration exit bottom. ° Proof | 12-13 | 12 |
| 4. Steam into calandria. Lbs. per hour | 650-700 | 662 |
| 5. Reflux to top plate. Gallons per hour | 50 | 64.2 |
| 6. Alcohol concentration at condenser. ° Proof | 10-14 | 9.83 |
| 7. Heads draw-off rate. Gallons per hour | 0.5 | 0.554 |
| *Rectifying column* | | |
| 1. Reflux to top plate. Gallons per hour | 500 | 532 |
| 2. Heads draw-off rate. Gallons per hour | 3 | 3 |
| 3. Product draw-off rate. Gallons per hour | 66 | 65.5 |
| 4. Alcohol in product. ° Proof | 189.3 | 189.3 |
| 5. Fusel oil draw-off rate. Gallons per hour | 4 | 4.15 |
| 6. Alcohol in fusel oil draw-off. ° Proof | 135 | 135 |
| 7. Steam to calandria. Lbs per hour | 1 600 | 1 546 |

TABLE 3

*Comparison of measured concentration of higher boiling alcohols in light-bodied rum vs. computed concentration*

| Stream | Flow rate Proof gallons per hr. | Higher boiling alcohol concentration Grams per 100 proof liters | | |
|---|---|---|---|---|
| | | Iso-amyl | Iso-butyl | N-propyl |
| Rum from beer still | 124.8 | 98.25** | 18.65** | 46.1** |
| Heads from rectifying col. | 5.82 | 0.00* | 0.00* | 0.00* |
| F.O. draw-off rectifying col. | 5.605 | 1 380.2* | 106.3* | 756.9* |
| Feed to extractive col. | 136.22 | 146.81* | 21.46* | 73.38* |
| Product from extractive col. | 136.166 | 57.10* | 5.65* | 73.14* |
| Product from rectifying col. | 123.98* | 0.3* | 1.4* | 46.2* |
| Product from rectifying col. | 124.8** | N.M.A.** | 6.1** | 49.0** |

N.M.A. : No measurable amount.
* : Computed values.
** : Values measured.

TABLE 4

*Comparison of computed fusel oil concentrations in neutral spirits produced by* GUILLAULE *vs* BARBET *distillation processes*

| | GUILLAUME process | | | | BARBET process | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Proof gallons per hour | Fusel oil concentrations Grams per 100 proof liters | | | Proof gallons per hour | Fusel oil concentrations Grams per 100 proof liters | | |
| | | Amyl | Butyl | Propyl | | Amyl | Butyl | Propyl |
| Feed to process | 500 | 98.25 | 18.65 | 46.1 | 500 | 98.25 | 18.65 | 46.1 |
| *Extractive distillation colum* | | | | | | | | |
| Feed to process | 500 | 98.25 | 18.65 | 46.1 | | | | |
| Heads recycle from rect. col. | 24.7 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | | | | |
| Fusel oil recycle from rect. col. | 24.7 | 4.9 | 0.0 | 8 641 | | | | |
| Total feed to column | 549.4 | 89.64 | 16.97 | 430.4 | | | | |
| Product to rect. column | 544.4 | 0.2 | 0.0 | 394.5 | | | | |
| Heads and fusel oil to storage | 5.0 | 9 825 | 1 865 | 4 270 | | | | |
| *Heads purifying column* | | | | | | | | |
| Feed to process | | | | | 500 | 98.25 | 18.65 | 46.1 |
| Heads recycle from rect. col. | | | | | 29.05 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| Heads recycle from fused oil col. | | | | | 57.12 | 0.0 | 0.0 | 1.2 |
| Total feed to column | | | | | 586.17 | 83.81 | 15.91 | 39.44 |
| Product to rect. column | | | | | 582.17 | 84.39 | 16.02 | 39.71 |
| Heads to storage | | | | | 4.0 | — | — | — |
| *Fusel oil concentrating column* | | | | | | | | |
| Feed from rect. column | | | | | 58.12 | 845 | 160.5 | 397.5 |
| Heads to purifying column | | | | | 57.12 | 0.0 | 0.0 | 1.2 |
| Fusel oil draw-off to storage | | | | | 1.0 | 49 130 | 9 334 | 23 035 |
| *Rectifying column* | | | | | | | | |
| Feed from extract. or purifying col. | 544.4 | 0.2 | 0.0 | 394.5 | 582.17 | 84.39 | 16.02 | 39.71 |
| Heads to extract. or purifying col. | 24.7 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 29.05 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| Fusel oil draw off to extract. or f.o. col. | 24.7 | 4.9 | 0.0 | 8 641 | 58.12 | 845 | 160.5 | 397.5 |
| Alcohol loss at bottom of col. | 1.9 | — | — | — | .03 | — | — | — |
| Neutral spirits product | 493.1 | 0.0 | 0.0 | 3.4 | 495 | 0.0 | 0.0 | 0.2 |

the fusel oil draw-off stream from plate 21 of this column are recycled to the feed stream of the extractive distillation column, it is necessary to calculate the concentration of higher boiling alcohols in this feed stream.

The computed concentrations of higher boiling alcohols in the distilled rum product agree with the actual values, with the exception that actual *iso*-butyl alcohol concentration is appreciably higher (6.1 grams per 100 proof liters) than the computed value (1.4 grams per 100 proof liters). This difference probably indicates an error in the data on volatility of iso-butyl alcohol used in the computer program. It should be noted that very little *n*-propyl alcohol was removed in this operation due to the fact, previously mentioned, that degree of removal of this congener by extractive distillation is relatively poor and because only a samll fraction (0.04 p. 100) of the ethanol fed to this column was removed in the hads stream.

Appendix shows the print-out generated by the computer program for the extractive distillation operation and for the rectification operation.

## *Comparison of* Guillaume *and* Barbet *processes for production of neutral spirits*

The question may arise as to which process produces the purest grade of neutral spirits in terms of fusel oil removal, the Guillaume system consisting of an extractive distillation colum and a rectifying column or a Barbet system consisting of a heads purifying column, a rectifying column and a fusel oil concentrating column. Computations were performed for both processes in which 1 p. 100 of the ethanol in the feed was removed as heads and tails. The following results represent a hypothetical operation and not an actual one conducted in the distillery.

### Guillaume *process.*

For the Guillaume process, conditions were assumed as shown in figure 9 such that fusel oil removal could be achieved in the extractive distillation column by operating at 13° U.S. proof at the bottom of the column and at a « pinch-proof » of 37° 6 which is optimum for fusel oil removal at this bottom proof. In this operation, feed at a rate of 500 proof gallons per hour is combined with recycled heads and tails from the rectifying colum. Five proof gallons per hour (1 p. 100 of the ethanol in the feed) are removed from the extractive distillation column condenser stream. The product from the bottom of this column is transferred to the rectifying column and neutral spirits at 192° 8 proof are removed from Plate 45 of this column. Heads are removed from the condenser and fusel oils containing 130° proof ethyl alcohol are removed from Plate 21 for recycle to the extractive distillation column.

### Barbet *system.*

For the Barbet process, as shown in figure 10, feed at a rate of 500 proof gallons per hour is combined with heads from the rectifying column and heads from the fusel oil concentrating column. This mixture is first distilled on a heads purifying column to strip and concentrate the low-boiling congeners (aldehydes and esters) which are removed together with ethanol from the condenser stream at a rate of 4 proof gallons per hour.

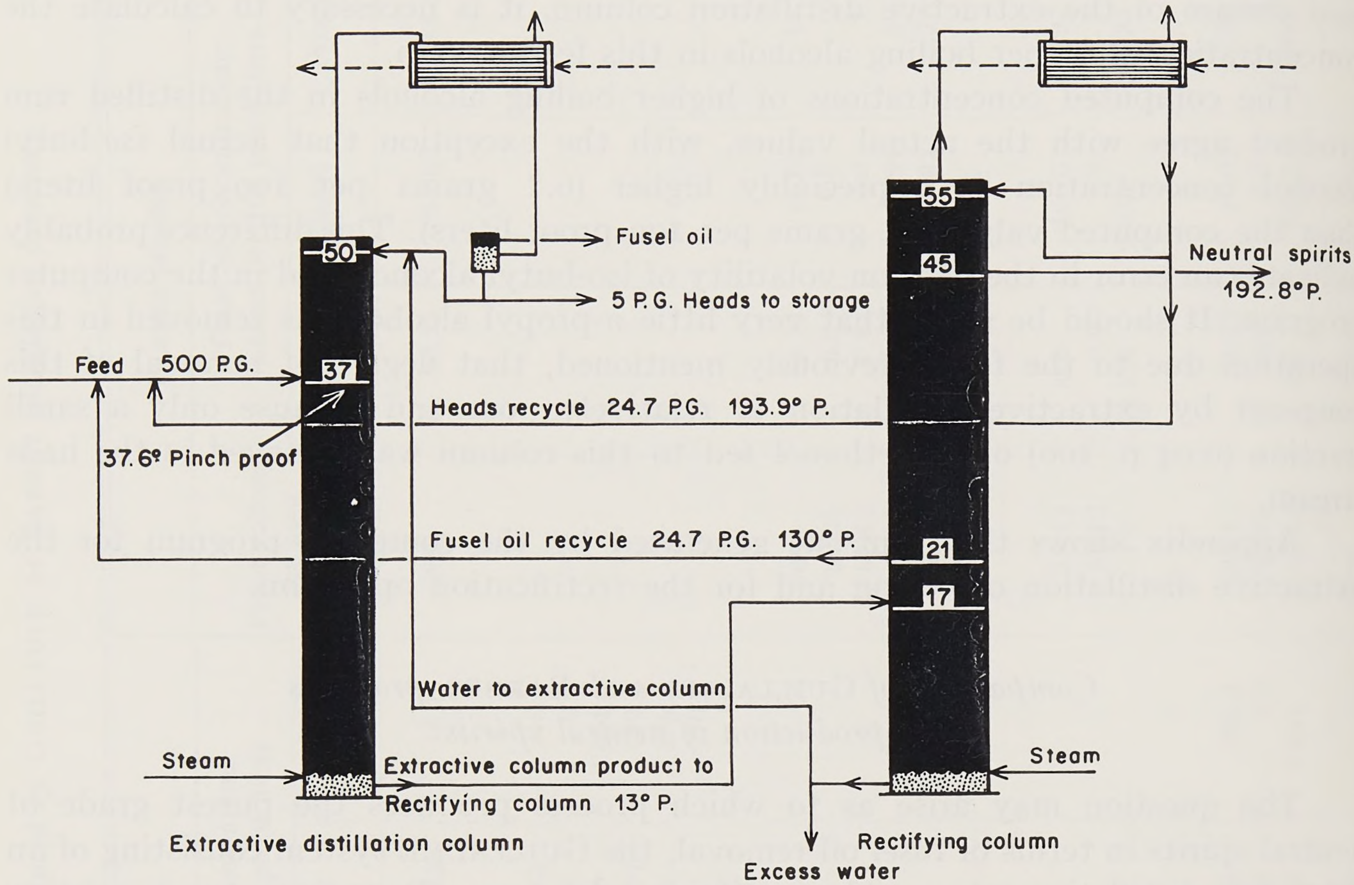



Fig. 9. — *Distillation of neutral spirits by* Guillaume *process*

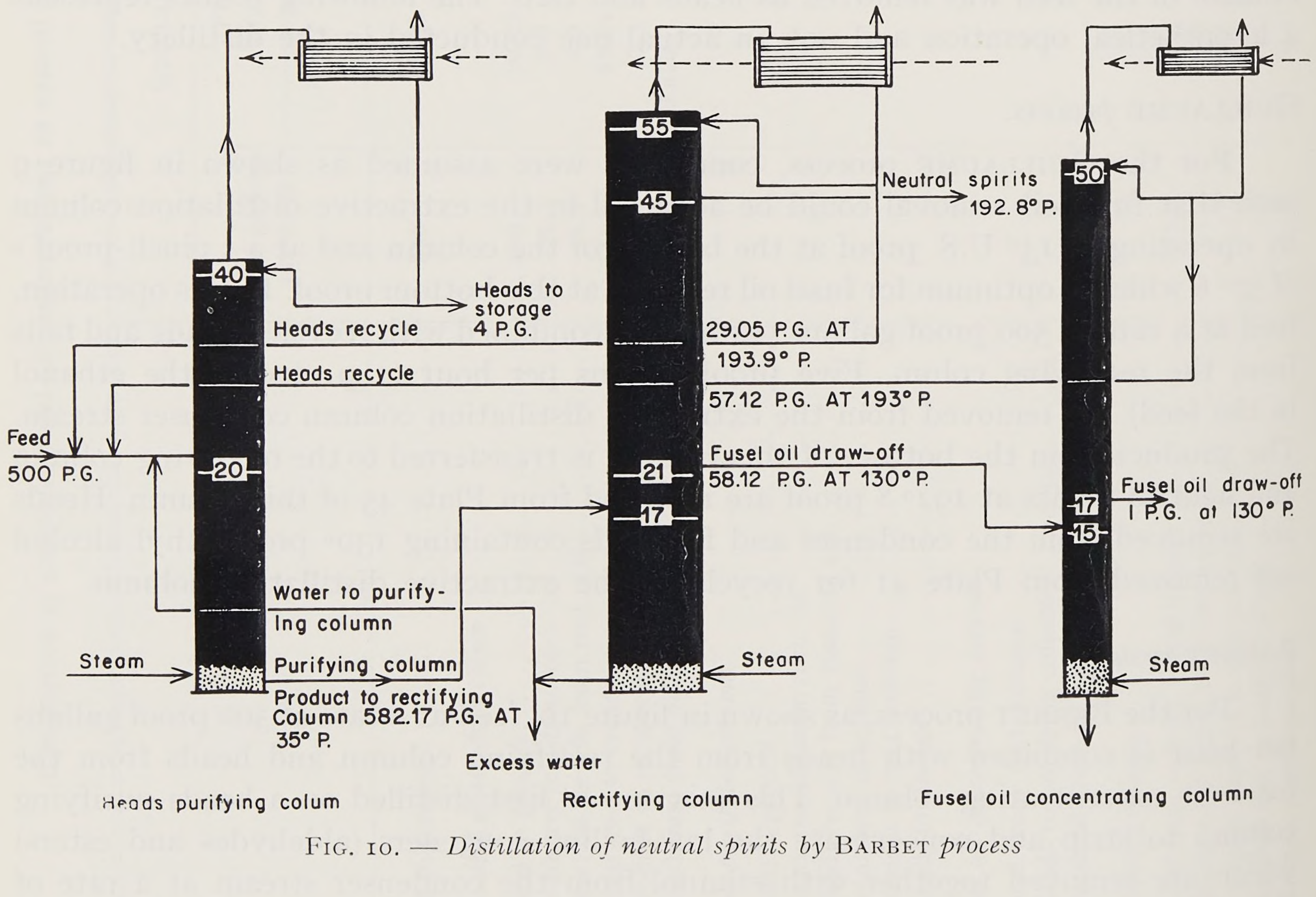



Fig. 10. — *Distillation of neutral spirits by* Barbet *process*

The product from the bottom of this column at 35° proof is then transferred to the rectifying column. In this column, heads are removed from the condenser and recycled to the heads purifying column, neutral spirits are with-drawn from Plate 45 as product and fusel oils containing 130° proof ethanol are withdrawn from Plate 21 and transferred to a fusel oil concentrating column. Heads from the condenser of this column are also transferred to the heads purifying column and fusel oils containing 130° proof ethanol are withdrawn from Plate 17 at a rate of one proof gallon per hour.

In order to compare-fusel oil removal in these two distillation processes, the higher-boiling alcohols in the various streams into and out of the distilling columns for both the GUILLAUME and BARBET systems were computed and are illustrated in table 4. Our results show that the neutral spirits produced by the GUILLAUME process contain no measurable amount of amyl or butyl alcohols, but do contain 3.4 grams per 100 proof liters of *n*-propyl alcohol. The neutral spirits produced by the BARBET process also contain no measurable amount of amyl or butyl alcohols and only 0.2 grams per 100 proof liters of *n*-propyl alcohol.

## CONCLUSIONS

Our overall conclusions based upon computations such as these, and also upon actual operations conducted in our distilleries, is that a BARBET system yields a more neutral, more nearly pure spirit than a system based upon the GUILLAUME extractive distillation process. The GUILLAUME system, however, does have an advantage in that only two distilling columns are required while the BARBET process requires at least three columns to produce a neutral spirits.

For producing distillates with intermediate flavor intensity, the extractive distillation and rectification system described in this report is entirely satisfactory and produces light-bodied rum of good quality.

## RÉSUMÉ


### PRODUCTION DE RHUM LÉGER PAR LA MÉTHODE DE DISTILLATION AVEC EXTRACTION

La distillation avec extraction permet de séparer simultanément des produits de tête et l'huile de fusel du « high wine » (alcool à 60-70 p. 100) du rhum en ajoutant de l'eau sur le plateau supérieur de la colonne de distillation. Ces impuretés sont chassés du condenseur tandis que l'éthanol à 5-10 p. 100 par volume est chassé à la base.

La quantité d'alcool amylique, butylique et propylique éliminée au cours de cette opération est fonction de : 1) la volatilité de l'impureté particulière par rapport à l'éthanol, 2) la concentration d'éthanol à la base, 3) taux de reflux (L/V) dans les plateaux d'épuisement, 4) la quantité de distillat chassée du condenseur. L'effet de ces variables sur le pourcentage d'enlèvement des impuretés est décrit pour une colonne formée de 25 plateaux d'épuisement et 10 plateaux de concentration.

En mettant en série une colonne de distillation avec extraction et une colonne de rectification, on peut produire du rhum léger à 189-190° proof. Grâce à un traitement par ordinateur des performances de ces deux colonnes, on peut prévoir la composition de l'huile de fusel du rhum pour toutes les conditions expérimentales.

Les avantages et inconvénients de cette méthode seront comparés à ceux d'un dispositif de Barbet où l'huile de fusel est chassée à l'aide d'une colonne de concentration d'huile de fuse .

## RESUMEN

### PRODUCCIÓN DE RON LIGERO, POR EL MÉTODO DE DESTILACIÓN CON EXTRACCIÓN

La destilación con extracción permite separar simultáneamente los productos de cabeza y el aceite de fusel del « high wine » (alcohol de 60-70 p. 100) del ron, por adición de agua sobre el plato superior de la columna de destilación. Estos congéneres son expulsados del condensador mientras que el etanol de 5-10 p. 100 por volumen es expulsado en la base.

La cantidad de alcohol amílico, butílico y propílico eliminado durante el trancurso de esta operación guarda relación con : 1) la volatilidad del congénere particular en relación con el etanol, 2) la concentración de etanol en la base, 3) grado de reflujo (L/V) en los platos de agotamiento y, 4) la cantidad de destilado que se envía hacia el condensador. El efecto de estas variables sobre el porcentaje de eliminación de los congéneres figura descrito para una columna formada por 25 platos de agotamiento y 10 platos de concentración.

Poniendo en serie una columna de destilación con extracción y una columna de rectificación, se puede producir un ron ligero de 189-190°. Mediante procesamiento por computador electrónico de las actuaciones de estas dos columnas, se puede prever la composición del aceite de fusel del ron para la totalidad de condiciones experimentales.

Las ventajas e inconvenientes de este método serán comparados a los de un dispositivo de Barbet, en el cual el aceite de fusel es evacuado por medio de una columna de concentración de aceite de fusel.

## RIASSUNTO

### PRODUZIONE DEL RUM LEGGERO CON IL METODO DI DISTILLAZIONE CON ESTRAZIONE

La distillazione con estrazione permette di separare simultaneamente i prodotti di testa e l'olio di flemma dell « high wine » (alcool da 60 a 70 p. 100) del rum aggiungendo dell'acqua sul piatto superiore della colonna di distillazione. Questi congeneri sono espulsi dal condensatore mentre l'etanolo a 5-10 p. 100 per volume è espulso alla base.

La quantità di alcool amilico, butilico e propilico eliminata durante questa operazione dipende : 1) dalla volatilità del congenere in particolare rispetto all'etanolo, 2) dalla concentrazione dell'etanolo alla base, 3) dal tasso di riflusso (L/V) nei piatti d'esaurimento, 4) dalla quantità di distillato espulsa dal condensatore. Si ha dunque la descrizione dell' effetto di questi variabili sulla percentuale di ritiro dei congeneri per una colonna formata da 25 piatti di esaurimento e da 10 piatti di concentrazione.

Mettendo in serie una colonna di distillazione con estrazione e una colonna di rettificazione, si puo' produrre del rum leggero a 189-190°. Se le prestazioni di queste due colonne vengono elaborate da un calcolatore elettronico, è possibile prevedere la composizione dell' olio di flemma del rum per tute le condizioni sperimentali.

I vantaggi e gli inconvenienti di questo metodo saranno confrontati con quelli di un dispositivo di Barbet dove l'olio di flemma è espulso mediante una colonna di concentrazione d'olio di flemma.

## LITERATURE CITED

ALTSHELER W.B., UNGER E. D., KOLACHOV P., 1954. *Ind. Eng. Chem.*, **43**, 2559.

CAREY J. S., LEWIS W. K., 1932. *Ind. Eng. Chem.*, **24**, 882.

CORNELL L. W., MONTONNA R. E., 1933. *Ind. Eng. Chem.*, **25**, 1331.

DODGE W. B., 1950. Thesis, University of Louisville.

GUILLAUME E., 1911. U.S. Patent no 996328.

JONES C.-A., SCHOENBURN E. M., COLBURN A. P., 1943. *Ind. Eng. Chem.*, **35**, 666.

JOHNS-MANVILLE Technical data catalog, 1939.

KIRK R. E., OTHMER D. F., 1963. *Encyclopedia of Chemical Technology*, **1**, 501.

KIRSCHBAUM E., GERSTNER F., 1939. *Verfahrenstechnik Z.*, **1**, 10.

OTSUKI H., WILLIAMS E.-C. Symposium 6, University of California, Berkeley, Cal.

RICARD E., GUINOT H. M., 1933. U.S. Patent 1, 912, 010.

RIEDER R. M., THOMPSON A. R., 1949. *Ind. Eng. Chem.*, **41**, 2905.

SCHOENBURN E. M., PLANT C. A., WINSLOW C. E., 1959. Final report north Carolina State College, A.E.Ch.E. Research Committee.

SMITH D. A., KUONG J., BROWN G. G., WHITE R. R., 1945. *Petroleum Refiner*, **24**, 296.

---

## APPENDIX

### EXTRACTIVE DISTILLATION COLUMN

*Production of light-bodied rum computer print-out of extractive distillation column performance*

*Operating data required for calculations*

P.G. feed per HR. = ? 136.22
Total plates = ? 50
Stripping plates = ? 37
Feed proof = ? 159.98
Pinch proof = ? 19.6
Proof at base = ? 12
Iso-amyl alc. in feed (G. per 100 P.L.) = ? 146.86
Iso-butyl alcohol in feed (G. per 100 P.L.) = ? 21.41
*n*-propyl alc. in feed (G. per 100 P.L.) = ? 73.4
P. 100 of total alc. in feed recovered as prod. = ? 99.96
Type still diameter and plate spacing (inches) = ? 24,10.

*Production of light-bodied rum*
*computer print-out of extractive distillation column performance*

*Alcohol concentrations, reflux ratio and moles vapor per hour from each plate*

| Plate n° | Alcohol in liquid | | Alcohol in vapor | | Reflux ratio above | Moles vapor plate |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | Mol (%) | Proof | Mol (%) | Proof | | |
| Calandria | 1.9337 | 12.000 | 17.2848 | 83.248 | | |
| 1 | 2.9628 | 18.010 | 20.6975 | 94.667 | 14.9939 | 36.080 |
| 2 | 3.1889 | 19.305 | 22.8729 | 101.323 | 15.0291 | 35.989 |
| 3 | 3.3307 | 20.113 | 24.2186 | 105.224 | 15.0690 | 35.887 |
| 4 | 3.4163 | 20.598 | 25.0336 | 107.516 | 15.1196 | 35.758 |
| 5 | 3.4653 | 20.875 | 25.5147 | 108.842 | 15.1776 | 35.612 |
| 6 | 3.4911 | 21.021 | 25.7890 | 109.589 | 15.2402 | 35.455 |
| 7 | 3.5028 | 21.087 | 25.9365 | 109.988 | 15.3059 | 35.293 |
| 8 | 3.5057 | 21.103 | 26.0068 | 110.177 | 15.3735 | 35.127 |
| 9 | 3.5034 | 21.090 | 26.0303 | 110.240 | 15.4427 | 34.958 |
| 10 | 3.4979 | 21.059 | 26.0255 | 110.227 | 15.5131 | 34.789 |
| 11 | 3.4905 | 21.018 | 26.0036 | 110.169 | 15.5844 | 34.619 |
| 12 | 3.4820 | 20.970 | 25.9715 | 110.082 | 15.6565 | 34.448 |
| 13 | 3.4728 | 20.918 | 25.9331 | 109.978 | 15.7294 | 34.278 |
| 14 | 3.4632 | 20.864 | 25.8910 | 109.865 | 15.8031 | 34.107 |
| 15 | 3.4535 | 20.809 | 25.8468 | 109.745 | 15.8775 | 33.937 |
| 16 | 3.4436 | 20.753 | 25.8012 | 109.622 | 15.9526 | 33.766 |
| 17 | 3.4336 | 20.696 | 25.7549 | 109.496 | 16.0284 | 33.596 |
| 18 | 3.4237 | 20.640 | 25.7081 | 109.369 | 16.1048 | 33.426 |
| 19 | 3.4137 | 20.584 | 25.6611 | 109.241 | 16.1821 | 33.256 |
| 20 | 3.4038 | 20.527 | 25.6140 | 109.113 | 16.2600 | 33.086 |
| 21 | 3.3938 | 20.471 | 25.5668 | 108.984 | 16.3387 | 32.916 |
| 22 | 3.3839 | 20.415 | 25.5196 | 108.855 | 16.4181 | 32.747 |
| 23 | 3.3741 | 20.359 | 25.4725 | 108.726 | 16.4982 | 32.577 |
| 24 | 3.3642 | 20.303 | 25.4254 | 108.597 | 16.5792 | 32.408 |
| 25 | 3.3544 | 20.248 | 25.3783 | 108.468 | 16.6609 | 32.239 |
| 26 | 3.3447 | 20.192 | 25.3313 | 108.339 | 16.7434 | 32.070 |
| 27 | 3.3349 | 20.137 | 25.2843 | 108.210 | 16.8266 | 31.901 |
| 28 | 3.3252 | 20.082 | 25.2375 | 108.081 | 16.9107 | 31.733 |
| 29 | 3.3155 | 20.027 | 25.1906 | 107.951 | 16.9956 | 31.564 |
| 30 | 3.3059 | 19.972 | 25.1439 | 107.822 | 17.0814 | 31.396 |
| 31 | 3.2963 | 19.917 | 25.0972 | 107.693 | 17.1679 | 31.228 |
| 32 | 3.2867 | 19.863 | 25.0505 | 107.563 | 17.2554 | 31.060 |
| 33 | 3.2772 | 19.809 | 25.0039 | 107.434 | 17.3437 | 30.892 |
| 34 | 3.2677 | 19.755 | 24.9574 | 107.305 | 17.4329 | 30.725 |
| 35 | 3.2582 | 19.701 | 24.9110 | 107.176 | 17.5230 | 30.557 |
| 36 | 3.2488 | 19.647 | 24.8646 | 107.046 | 17.6140 | 30.390 |
| 37 | 3.2394 | 19.593 | 24.8129 | 106.902 | 18.9755 | 27.042 |
| 38 | 1.3069 | 8.188 | 18.7565 | 88.329 | 19.1837 | 26.732 |
| 39 | 0.9770 | 6.159 | 14.5409 | 73.076 | 19.3076 | 26.551 |
| 40 | 0.7524 | 4.763 | 11.4737 | 60.483 | 19.4011 | 26.417 |
| 41 | 0.5906 | 3.750 | 9.1699 | 50.141 | 19.4864 | 26.295 |
| 42 | 0.4698 | 2.990 | 7.3984 | 41.648 | 19.5675 | 26.180 |
| 43 | 0.3773 | 2.406 | 6.0114 | 34.641 | 19.6467 | 26.069 |
| 44 | 0.3052 | 1.948 | 4.9104 | 28.838 | 19.7261 | 25.958 |
| 45 | 0.2482 | 1.586 | 4.0268 | 24.017 | 19.8068 | 25.847 |
| 46 | 0.2025 | 1.295 | 3.3116 | 20.004 | 19.8899 | 25.733 |
| 47 | 0.1657 | 1.061 | 2.7288 | 16.657 | 19.9758 | 25.617 |
| 48 | 0.1358 | 0.870 | 2.2514 | 13.863 | 20.0650 | 25.497 |
| 49 | 0.1114 | 0.714 | 1.8588 | 11.528 | 20.1578 | 25.373 |
| 50 | 0.0914 | 0.586 | 1.5767 | 9.829 | 17.7682 | 28.989 |

*Production of light-bodied rum*
*computer print-out of extractive distillation column performance*

*Fusel oil concentrations from calandria and plates 1-14*

Congeners (Grams per 100 p.l. first row) (mol p. 100 second row)

| Plate n° | Amyl alcohol | | Butyl alcohol | | Propyl alcohol | | Colorimetric f.o. | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | liquid | vapor | liquid | vapor | liquid | vapor | liquid product | vapor |
| Cal | 57.10 | 137.81 | 5.65 | 13.52 | 73.14 | 95.97 | 68.37 | 153.40 |
| Cal | 0.0015 | 0.0314 | 0.0002 | 0.0037 | 0.0027 | 0.0321 | | |
| 1 | 89 | 183 | 9 | 18 | 82 | 104 | 102 | 201 |
| 1 | 0.0035 | 0.0500 | 0.0004 | 0.0060 | 0.0047 | 0.0415 | | |
| 2 | 112 | 231 | 11 | 24 | 86 | 110 | 126 | 251 |
| 2 | 0.0047 | 0.0697 | 0.0006 | 0.0085 | 0.0053 | 0.0486 | | |
| 3 | 137 | 283 | 14 | 30 | 90 | 115 | 152 | 306 |
| 3 | 0.0060 | 0,0904 | 0.0007 | 0.0113 | 0.0058 | 0.0538 | | |
| 4 | 163 | 339 | 17 | 36 | 93 | 119 | 180 | 366 |
| 4 | 0.0074 | 0.1121 | 0.0009 | 0.0143 | 0.0061 | 0.0576 | | |
| 5 | 192 | 400 | 20 | 44 | 95 | 122 | 210 | 431 |
| 5 | 0.0088 | 0.1348 | 0.0011 | 0.0176 | 0.0064 | 0.0603 | | |
| 6 | 222 | 467 | 24 | 52 | 97 | 125 | 243 | 501 |
| 6 | 0.0102 | 0.1588 | 0.0013 | 0.0212 | 0.0065 | 0.0624 | | |
| 7 | 255 | 537 | 28 | 62 | 98 | 127 | 277 | 577 |
| 7 | 0.0118 | 0.1840 | 0.0016 | 0.0251 | 0.0067 | 0.0638 | | |
| 8 | 289 | 613 | 33 | 72 | 99 | 129 | 314 | 659 |
| 8 | 0.0134 | 0.2104 | 0.0018 | 0.0294 | 0.0067 | 0.0649 | | |
| 9 | 326 | 694 | 38 | 83 | 100 | 130 | 353 | 745 |
| 9 | 0.0151 | 0.2383 | 0.0021 | 0.0340 | 0.0068 | 0.0656 | | |
| 10 | 364 | 779 | 43 | 95 | 101 | 131 | 395 | 838 |
| 10 | 0.0168 | 0.2674 | 0.0024 | 0.0390 | 0.0068 | 0.0662 | | |
| 11 | 404 | 868 | 49 | 109 | 101 | 132 | 438 | 936 |
| 11 | 0.0186 | 0.2979 | 0.0027 | 0.0443 | 0.0068 | 0.0665 | | |
| 12 | 446 | 962 | 55 | 123 | 101 | 133 | 484 | 1 039 |
| 12 | 0.0205 | 0.3297 | 0.0030 | 0.0501 | 0.0068 | 0.0667 | | |
| 13 | 489 | 1 060 | 62 | 138 | 102 | 133 | 532 | 1 147 |
| 13 | 0.0224 | 0.3628 | 0.0034 | 0.0563 | 0.0068 | 0.0668 | | |
| 14 | 535 | 1 162 | 69 | 155 | 102 | 133 | 582 | 1 261 |
| 14 | 0.0244 | 0.3972 | 0.0037 | 0.0629 | 0.0068 | 0.0668 | | |

*Production of light-bodied rum*
*Computer print-out of extractive distillation column performance*

*Fusel oil concentrations from plates 15-33*

Congeners (Grams per 100 p.l. first row) (mol p. 100 second row)

| Plate n° | Amyl alcohol | | Butyl alcohol | | Propyl alcohol | | Colorimetric f.o. | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | liquid | vapor | liquid | vapor | liquid | vapor | liquid product | vapor |
| 15 | 581 | 1 268 | 76 | 172 | 102 | 133 | 634 | 1 380 |
| 15 | 0.0265 | 0.4327 | 0.0041 | 0.0700 | 0.0068 | 0.0667 | | |
| 16 | 630 | 1 378 | 85 | 191 | 102 | 133 | 688 | 1 504 |
| 16 | 0.0286 | 0.4693 | 0.0046 | 0.0774 | 0.0068 | 0.0666 | | |
| 17 | 679 | 1 492 | 93 | 211 | 102 | 133 | 744 | 1 632 |
| 17 | 0.0308 | 0.5070 | 0.0050 | 0.0854 | 0.0067 | 0.0665 | | |
| 18 | 730 | 1 608 | 102 | 232 | 101 | 133 | 802 | 1 765 |
| 18 | 0.0330 | 0.5455 | 0.0055 | 0.0937 | 0.0067 | 0.0663 | | |
| 19 | 782 | 1 727 | 112 | 255 | 101 | 133 | 862 | 1 903 |
| 19 | 0.0352 | 0.5849 | 0.0060 | 0.1025 | 0.0067 | 0.0661 | | |
| 20 | 835 | 1 849 | 122 | 278 | 101 | 133 | 923 | 2 044 |
| 20 | 0.375 | 0.6250 | 0.0065 | 0.1117 | 0.0067 | 0.0659 | | |
| 21 | 8089 | 1 973 | 132 | 302 | 101 | 133 | 985 | 2 188 |
| 21 | 0.0398 | 0.6656 | 0.0070 | 0.1214 | 0.0066 | 0.0656 | | |
| 22 | 943 | 2 098 | 143 | 328 | 101 | 132 | 1 049 | 2 336 |
| 22 | 0.0421 | 0.7066 | 0.0076 | 0.1314 | 0.0066 | 0.0654 | | |
| 23 | 997 | 2 225 | 154 | 355 | 100 | 132 | 1 113 | 2 486 |
| 23 | 0.0444 | 0.7479 | 0.0082 | 0.1418 | 0.0066 | 0.0652 | | |
| 24 | 1 052 | 2 352 | 166 | 382 | 100 | 132 | 1 178 | 2 639 |
| 24 | 0.0467 | 0.7892 | 0.0088 | 0.1525 | 0.0065 | 0.0649 | | |
| 25 | 1 106 | 2 480 | 178 | 411 | 100 | 132 | 1 244 | 2 793 |
| 25 | 0.0490 | 0.8305 | 0.0094 | 0.1636 | 0.0065 | 0.0647 | | |
| 26 | 1 160 | 2 607 | 190 | 440 | 100 | 131 | 1 309 | 2 948 |
| 26 | 0.0512 | 0.8714 | 0.0100 | 0.1749 | 0.0065 | 0.0644 | | |
| 27 | 1 214 | 2 733 | 203 | 470 | 100 | 131 | 1 375 | 3 103 |
| 27 | 0.0534 | 0.9119 | 0.0106 | 0.1865 | 0.0064 | 0.0641 | | |
| 28 | 1 266 | 2 858 | 215 | 501 | 99 | 131 | 1 440 | 3 258 |
| 28 | 0.0556 | 0.9518 | 0.0112 | 0.1983 | 0.0064 | 0.0639 | | |
| 29 | 1 318 | 2 980 | 228 | 532 | 99 | 130 | 1 504 | 3 412 |
| 29 | 0.0577 | 0.9908 | 0.0119 | 0.2102 | 0.0064 | 0.0636 | | |
| 30 | 1 368 | 3 100 | 242 | 563 | 99 | 130 | 1 568 | 3 564 |
| 30 | 0.0597 | 1.0287 | 0.0125 | 0.2223 | 0.0063 | 0.0633 | | |
| 31 | 1 416 | 3 217 | 255 | 595 | 99 | 130 | 1 630 | 3 714 |
| 31 | 0.0616 | 1.0654 | 0.0132 | 0.2344 | 0.0063 | 0.0631 | | |
| 32 | 1 462 | 3 329 | 268 | 627 | 98 | 130 | 1 690 | 3 860 |
| 32 | 0.0634 | 1.1007 | 0.0138 | 0.2464 | 0.0063 | 0.0628 | | |
| 33 | 1 507 | 3 437 | 281 | 659 | 98 | 129 | 1 748 | 4 003 |
| 33 | 0.0652 | 1.1343 | 0.0144 | 0.2585 | 0.0062 | 0.0626 | | |

*Production of light-bodied rum*
*Computer print-out of extractive distillation column performance*

*Fusel oil concentrations from plates 34-50*

| Plate n° | Congeners (Grams per 100 p.l. first row) (mol p. 100 second row) | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Amyl alcohol | | Butyl alcohol | | Propyl alcohol | | Colorimetric f.o. | |
| | liquid | vapor | liquid | vapor | liquid | vapor | liquid product | vapor |
| 34 | 1 548 | 3 540 | 294 | 690 | 98 | 129 | 1 804 | 4 141 |
| 34 | 0.0668 | 1.1661 | 0.0151 | 0.2704 | 0.0062 | 0.0623 | | |
| 35 | 1 588 | 3 638 | 306 | 721 | 98 | 129 | 1 858 | 4 273 |
| 35 | 0.0683 | 1.1959 | 0.0157 | 0.2820 | 0.0062 | 0.0621 | | |
| 36 | 1 624 | 3 729 | 319 | 752 | 97 | 128 | 1 908 | 4 399 |
| 36 | 0.0696 | 1.2235 | 0.0163 | 0.2935 | 0.0061 | 0.0618 | | |
| 37 | 1 657 | 3 814 | 331 | 782 | 97 | 128 | 1 955 | 4 519 |
| 37 | 0.0708 | 1.2488 | 0.0168 | 0.3046 | 0.0061 | 0.0615 | | |
| 38 | 3 685 | 5 482 | 760 | 1 115 | 128 | 142 | 4 372 | 6 476 |
| 38 | 0.0636 | 1.3570 | 0.0156 | 0.3283 | 0.0032 | 0.0515 | | |
| 39 | 5 311 | 7 756 | 1 085 | 1 563 | 141 | 156 | 6 282 | 9 131 |
| 39 | 0.0685 | 1.4884 | 0.0166 | 0.3566 | 0.0027 | 0.0439 | | |
| 40 | 7 536 | 10 845 | 1 524 | 2 161 | 155 | 171 | 8 882 | 12 725 |
| 40 | 0.0748 | 1.6422 | 0.0180 | 0.3892 | 0.0023 | 0.0379 | | |
| 41 | 10 569 | 15 029 | 2 113 | 2 961 | 170 | 186 | 12 412 | 17 573 |
| 41 | 0.0824 | 1.8188 | 0.0196 | 0.4261 | 0.0019 | 0.0331 | | |
| 42 | 14 688 | 20 675 | 2 901 | 4 025 | 185 | 203 | 17 187 | 24 093 |
| 42 | 0.0911 | 2.0187 | 0.0214 | 0.4673 | 0.0017 | 0.0291 | | |
| 43 | 20 263 | 28 278 | 3 953 | 5 439 | 202 | 220 | 23 626 | 32 842 |
| 43 | 0.1009 | 2.2435 | 0.0234 | 0.5131 | 0.0015 | 0.0256 | | |
| 44 | 27 787 | 38 495 | 5 354 | 7 313 | 219 | 239 | 32 287 | 44 559 |
| 44 | 0.1119 | 2.4946 | 0.0256 | 0.5636 | 0.0013 | 0.0227 | | |
| 45 | 37 922 | 52 200 | 7 214 | 9 795 | 237 | 259 | 43 912 | 60 225 |
| 45 | 0.1242 | 2.7741 | 0.0281 | 0.6190 | 0.0011 | 0.0202 | | |
| 46 | 51 549 | 70 560 | 9 683 | 13 076 | 257 | 280 | 59 490 | 81 143 |
| 46 | 0.1378 | 3.0838 | 0.0308 | 0.6796 | 0.0010 | 0.0179 | | |
| 47 | 69 849 | 95 127 | 12 954 | 17 409 | 278 | 302 | 80 342 | 109 044 |
| 47 | 0.1528 | 3.4258 | 0.0337 | 0.7456 | 0.0009 | 0.0159 | | |
| 48 | 94 399 | 127 969 | 17 285 | 23 127 | 299 | 325 | 108 224 | 146 226 |
| 48 | 0.1692 | 3.8024 | 0.0369 | 0.8172 | 0.0008 | 0.0142 | | |
| 49 | 127 307 | 171 839 | 23 015 | 30 667 | 323 | 351 | 145 481 | 195 739 |
| 49 | 0.1872 | 4.2154 | 0.0403 | 0.8946 | 0.0007 | 0.0126 | | |
| 50 | 171 399 | 224 292 | 30 594 | 39 526 | 347 | 367 | 195 246 | heads 254 698 |
| 50 | 0.2069 | 4.6671 | 0.0439 | 0.9781 | 0.0006 | 0.0112 | | |

*Computer print-out of extractive distillation column performance*

*Summary of computed heat balance and required operating conditions*

*Heat balance in kilo B.T.U. per hour*

*Heat in*

| | |
|---|---|
| Feed at 75 F | 19.7 |
| Vapor into base | 765.5 |
| Water to top plate at 219.3 F | 1 639.9 |
| Reflux to top plate at B.P. | 93.7 |
| Heat in = | 2 518.9 |

*Heat out*

| | |
|---|---|
| Liq. exit base | 1 899.0 |
| Vapor to cond. | 603.5 |
| Radiation loss | 16.5 |
| Heat out = | 2 518.9 |

LB. moles of feed per hour = 18.7978
LB. moles of product per hour exit base = 504.893
LB. moles vapor per hour into base = 35.7994
LB. Moles vapor per hour to condenser = 28.9891
LB. moles of heads draw-off per HR. from condenser = .248046
LB. moles of condensate per HR. returned as reflux = 28.7411
LB. moles water per hour to top plate = 486.343
Wine gallons of feed per hour = 85.1481 to plate no 37
P.G. of product per hour exit base = 136.166
W.G. of product per hour exit base = 1 134.71
P.G. of heads per hour from condenser = .054488
W.G. of heads per hour from condenser = .554357
W.G. of condensate per hour returned as reflux = 64.2333
Gallons of water per hour (sp. gravity = 1) to top plate = 1 050.99
LBS. steam per hour into calandria = 662.253
P. 100 amyl alcohol in feed removed from product = 61.1
P. 100 butyl alcohol in feed removed from product = 73.63
P. 100 propyl alcohol in feed removed from product = 0.39

## Rectifying column

*Production of light-bodied rum*

*Computer print-out of rectifying column performance*
*Operating data required for calculations and computation of required reflux ratio*

For prod. draw-off from condenser, type 1 ;
For prod. draw-off from side of column, type 2 ? 2

Product proof = ? 189.3
F.O. draw-off proof = ? 135
Feed proof = ? 12
Total plates = ? 55
F.O. draw-off plate = ? 21
Feed plate = ? 17
P.G. product per HR. = ? 123.98
No of plates above product draw-off = ? 24
P. 100 of alc. in feed removed as heads = ? 4.3
Iso-amyl alc in feed (G. per 100 P.L.) = ? 57.1
Iso-butyl alc in feed (G. per 100 P.L.) = ? 5.65
*n* Propyl alc in feed (G. per 100 P.L.) = ? 73.14
P. 100 of alc. in feed removed at f.o. draw = ? 4.14

Is feed temp. boiling or cold (75 F), type hot or cold? hot

L/V above f.o. draw (D*XD/V) vap. to cond. (XD Calc-XD)
55 .864613 .111083 .888206 .888304 — .000014 13

L/V past. section (H*XH/V) L/V Below F.O. draw (H*XH + D*XD + S*XS)/V
.994391 .004983 .851572 .115881

(XS-X calc.) mole p. 100 alc. in stillage
.000011 .011174 14

*Production of light-bodied rum*
*Computer print-out of rectifying column performance*

*Alcohol concentrations and reflux ratio*
*from each plate in stripping section*

| Plate nº | Alcohol in liquid | | Alcohol in vapor | | Reflux ratio |
|---|---|---|---|---|---|
| | Mol (%) | Proof | Mol (%) | Proof | Above plate |
| Caldria | 0.0112 | 0.07 | 0.1322 | 0.85 | |
| 1 | 0.0290 | 0.19 | 0.2167 | 1.39 | 6.81170 |
| 2 | 0.0414 | 0.27 | 0.3260 | 2.08 | 6.82485 |
| 3 | 0.0573 | 0.37 | 0.4669 | 2.97 | 6.83875 |
| 4 | 0.0778 | 0.50 | 0.6480 | 4.11 | 6.85351 |
| 5 | 0.1041 | 0.67 | 0.8799 | 5.56 | 6.86929 |
| 6 | 0.1376 | 0.88 | 1.1757 | 7.38 | 6.88617 |
| 7 | 0.1803 | 1.15 | 1.5509 | 9.67 | 6.90422 |
| 8 | 0.2342 | 1.50 | 2.0240 | 12.51 | 6.92342 |
| 9 | 0.3019 | 1.93 | 2.6156 | 16.00 | 6.94366 |
| 10 | 0.3863 | 2.46 | 3.3479 | 20.21 | 6.96466 |
| 11 | 0.4903 | 3.12 | 4.2429 | 25.21 | 6.98602 |
| 12 | 0.6169 | 3.92 | 5.3198 | 31.02 | 7.00722 |
| 13 | 0.7688 | 4.87 | 6.5903 | 37.61 | 7.02766 |
| 14 | 0.9473 | 5.98 | 8.0545 | 44.85 | 7.04679 |
| 15 | 1.1526 | 7.24 | 9.6961 | 52.57 | 7.06417 |
| 16 | 1.3822 | 8.65 | 11.4792 | 60.51 | 7.07957 |

*Production of light-bodied rum*

*Computer print-out of rectifying column performance*

*Alcohol concentrations from each plate in rectifying section*

| Plate n° | Alcohol in liquid | | Alcohol in vapor | |
|---|---|---|---|---|
| | mol (%) | proof | mol (%) | proof |
| 17 | 1.6310 | 10.16 | 13.3458 | 68.33 |
| 18 | 2.0641 | 12.75 | 15.8670 | 78.11 |
| 19 | 5.0248 | 29.45 | 25.7251 | 109.42 |
| 20 | 16.6012 | 80.80 | 42.9133 | 146.15 |
| | Alc. in f.o. draw-off | | | |
| 21 | 36.7863 | 135.00 | 55.2673 | 164.20 |
| 22 | 51.0737 | 158.62 | 62.9868 | 173.11 |
| 23 | 60.0020 | 169.86 | 67.9494 | 178.04 |
| 24 | 65.7416 | 175.91 | 71.5791 | 181.32 |
| 25 | 69.9397 | 179.87 | 74.3254 | 183.64 |
| 26 | 73.1161 | 182.63 | 76.4596 | 185.35 |
| 27 | 75.5844 | 184.66 | 78.1523 | 186.66 |
| 28 | 77.5422 | 186.19 | 79.5533 | 187.71 |
| 29 | 79.1625 | 187.42 | 80.7480 | 188.58 |
| 30 | 80.5444 | 188.43 | 81.7940 | 189.33 |
| | Alc. in prod. draw-off | | | |
| 31 | 81.7541 | 189.30 | 82.7311 | 189.98 |
| 32 | 82.6967 | 189.96 | 83.5078 | 190.52 |
| 33 | 83.4778 | 190.50 | 84.1615 | 190.97 |
| 34 | 84.1352 | 190.95 | 84.7189 | 191.34 |
| 35 | 84.6957 | 191.33 | 85.1997 | 191.66 |
| 36 | 85.1792 | 191.65 | 85.6184 | 191.94 |
| 37 | 85.6003 | 191.93 | 85.9863 | 192.18 |
| 38 | 85.9702 | 192.17 | 86.3119 | 192.39 |
| 39 | 86.2977 | 192.38 | 86.6021 | 192.58 |
| 40 | 86.5895 | 192.57 | 86.8623 | 192.75 |
| 41 | 86.8512 | 192.74 | 87.0968 | 192.90 |
| 42 | 87.0871 | 192.89 | 87.3107 | 193.04 |
| 43 | 87.3021 | 193.03 | 87.5046 | 193.16 |
| 44 | 87.4971 | 193.16 | 87.6805 | 193.27 |
| 45 | 87.6740 | 193.27 | 87.8401 | 193.37 |
| 46 | 87.8345 | 193.37 | 87.9851 | 193.47 |
| 47 | 87.9803 | 193.46 | 88.1168 | 193.55 |
| 48 | 88.1128 | 193.55 | 88.2365 | 193.62 |
| 49 | 88.2332 | 193.62 | 88.3454 | 193.69 |
| 50 | 88.3427 | 193.69 | 88.4444 | 193.75 |
| 51 | 88.4422 | 193.75 | 88.5344 | 193.81 |
| 52 | 88.5327 | 193.81 | 88.6163 | 193.86 |
| 53 | 88.6151 | 193.86 | 88.6909 | 193.91 |
| 54 | 88.6901 | 193.91 | 88.7588 | 193.95 |
| 55 | 88.7584 | 193.95 | 88.8206 | 193.99 |

*Production of light-bodied rum*

*Computer print-out of rectifying column performance*

*Fusel oil concentrations from plates 46-55*

Congeners (Grams per 100 p.l. first row) (mol p. 100 second row)

| Plate nº | Amyl alcohol | | Butyl alcohol | | Propyl alcohol | | Colorimétric f.o. | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | liquid | vapor | liquid | vapor | liquid | vapor | liquid | vapor |
| | | | | | | | f.o. in heads | |
| 55 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| 55 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | | |
| 54 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| 54 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | | |
| 53 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| 53 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | | |
| 52 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| 52 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | | |
| 51 | 0.00 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| 51 | 0.000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | | |
| 50 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| 50 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | | |
| 49 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| 49 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0001 | 0.0000 | | |
| 48 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.1 | 0.0 | 0.0 | 0.0 |
| 48 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0001 | 0.0001 | | |
| 47 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.1 | 0.1 | 0.0 | 0.0 |
| 47 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0002 | 0.0001 | | |
| 46 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.1 | 0.1 | 0.0 | 0.0 |
| 46 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0002 | 0.0002 | | |

*Production of light-bodied rum*
*Computer print-out of rectifying column performance*
*Fusel oil concentrations from plates 32-45*

| Plate n° | Congeners (Grams per 100 p.l. first row) (mol p. 100 second row) | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | Amyl alcohol | | Butyl alcohol | | Propyl alcohol | | Colorimetric f.o. | |
| | liquid | vapor | liquid | vapor | liquid | vapor | liquid | vapor |
| 45 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.2 | 0.1 | 0.0 | 0.0 |
| 45 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0003 | 0.0002 | | |
| 44 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.3 | 0.2 | 0.0 | 0.0 |
| 44 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0005 | 0.0003 | | |
| 43 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.4 | 0.3 | 0.1 | 0.0 |
| 43 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0007 | 0.0005 | | |
| 42 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.7 | 0.4 | 0.1 | 0.1 |
| 42 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0011 | 0.0007 | | |
| 41 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 1.0 | 0.7 | 0.1 | 0.1 |
| 41 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0016 | 0.0011 | | |
| 40 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 1.4 | 1.0 | 0.2 | 0.1 |
| 40 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0024 | 0.0016 | | |
| 39 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 2.1 | 1.4 | 0.3 | 0.2 |
| 39 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0036 | 0.0024 | | |
| 38 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 3.1 | 2.1 | 0.5 | 0.3 |
| 38 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0052 | 0.0035 | | |
| 37 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 4.6 | 3.1 | 0.7 | 0.5 |
| 37 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0001 | 0.0000 | 0.0077 | 0.0052 | | |
| 36 | 0.0 | 0.0 | 0.1 | 0.0 | 6.8 | 4.6 | 1.1 | 0.7 |
| 36 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0001 | 0.0113 | 0.0076 | | |
| 35 | 0.0 | 0.0 | 0.1 | 0.1 | 10.1 | 6.8 | 1.6 | 1.1 |
| 35 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0002 | 0.0001 | 0.0165 | 0.0112 | | |
| 34 | 0.0 | 0.0 | 0.2 | 0.1 | 14.8 | 10.0 | 2.5 | 1.6 |
| 34 | 0.0000 | 0.0000 | 0.0003 | 0.0002 | 0.0240 | 0.0164 | | |
| 33 | 0.0 | 0.0 | 0.4 | 0.2 | 21.6 | 14.7 | 3.8 | 2.5 |
| 33 | 0.0001 | 0.0000 | 0.0006 | 0.0003 | 0.0350 | 0.0239 | | |
| 32 | 0.1 | 0.0 | 0.8 | 0.4 | 31.7 | 21.5 | 5.8 | 3.8 |
| 32 | 0.0001 | 0.0001 | 0.0010 | 0.0006 | 0.0507 | 0.0348 | | |

*Production of light-bodied rum*

*Computer print-out of rectifying column performance*

*Fusel oil concentrations from plates 17-31*

Congeners (Grams per 100 p.l. first row) (mol p. 100 second row)

| Plate n° | Amyl alcohol | | Butyl alcohol | | Propyl alcohol | | Colorimetric f.o. | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | liquid | vapor | liquid | vapor | liquid | vapor | liquid | vapor |
| | | | | | | | f.o. in prod | |
| 31 | 0.3 | 0.1 | 1.4 | 0.8 | 46.2 | 31.5 | 9.0 | 5.8 |
| 31 | 0.0004 | 0.0001 | 0.0018 | 0.0010 | 0.0731 | 0.0504 | | |
| 30 | 0.9 | 0.3 | 2.6 | 1.4 | 68.3 | 45.9 | 14.4 | 9.0 |
| 30 | 0.0009 | 0.0003 | 0.0032 | 0.0018 | 0.1065 | 0.0727 | | |
| 29 | 2.2 | 0.8 | 4.4 | 2.4 | 97.4 | 65.0 | 22.5 | 13.6 |
| 29 | 0.0023 | 0.0008 | 0.0055 | 0.0030 | 0.1492 | 0.1016 | | |
| 28 | 5.3 | 1.9 | 7.3 | 4.0 | 135.2 | 90.0 | 35.2 | 20.6 |
| 28 | 0.0055 | 0.0020 | 0.0089 | 0.0050 | 0.2030 | 0.1385 | | |
| 27 | 12.7 | 4.6 | 11.9 | 6.5 | 184.1 | 122.3 | 55.6 | 31.4 |
| 27 | 0.0127 | 0.0048 | 0.0141 | 0.0079 | 0.2693 | 0.1850 | | |
| 26 | 30.0 | 10.9 | 19.0 | 10.4 | 246.3 | 163.7 | 90.3 | 48.8 |
| 26 | 0.0290 | 0.0110 | 0.0218 | 0.0125 | 0.3486 | 0.2423 | | |
| 25 | 69.8 | 25.6 | 29.5 | 16.3 | 324.4 | 216.1 | 152.0 | 78.1 |
| 25 | 0.0644 | 0.0251 | 0.0324 | 0.0191 | 0.4392 | 0.3109 | | |
| 24 | 158.9 | 59.0 | 44.8 | 25.2 | 419.9 | 280.9 | 266.1 | 129.8 |
| 24 | 0.1379 | 0.0557 | 0.0462 | 0.0283 | 0.5343 | 0.3892 | | |
| 23 | 352.3 | 133.0 | 65.3 | 37.7 | 532.1 | 358.5 | 480.5 | 224.0 |
| 23 | 0.2790 | 0.1193 | 0.0615 | 0.0402 | 0.6180 | 0.4715 | | |
| 22 | 747.3 | 290.2 | 89.9 | 54.0 | 657.3 | 446.0 | 876.8 | 397.3 |
| 22 | 0.5037 | 0.2413 | 0.0720 | 0.0534 | 0.6498 | 0.5438 | | |
| | | | | | | | f.o. draw | |
| 21 | 1 380.2 | 597.1 | 106.3 | 72.1 | 756.9 | 534.0 | 1 462.0 | 702.3 |
| 21 | 0.6701 | 0.4355 | 0.0613 | 0.0625 | 0.5390 | 0.5713 | | |
| 20 | 1 428.0 | 1 023.0 | 77.0 | 79.1 | 658.1 | 572.4 | 1 443.7 | 1 085.8 |
| 20 | 0.3129 | 0.5794 | 0.0200 | 0.0533 | 0.2115 | 0.4755 | | |
| 19 | 481.0 | 810.6 | 23.7 | 44.8 | 370.9 | 394.8 | 504.0 | 824.3 |
| 19 | 0.0319 | 0.2752 | 0.0019 | 0.0181 | 0.0361 | 0.1966 | | |
| 18 | 99.9 | 171.6 | 5.7 | 10.5 | 151.5 | 153.7 | 116.4 | 186.1 |
| 18 | 0.0027 | 0.0359 | 0.0002 | 0.0026 | 0.0061 | 0.0472 | | |
| 17 | 34.4 | 63.0 | 3.2 | 5.7 | 71.6 | 83.8 | 44.7 | 75.0 |
| 17 | 0.0007 | 0.0111 | 0.0001 | 0.0012 | 0.0023 | 0.0217 | | |

*Production of light-bodied rum*

*Computer print-out of rectifying column performance*

*Summary of required operating conditions*

LB. moles per HR. — Vapor to condenser = 83.9579
LB. moles per HR. — Heads draw-off = .471
LB. moles per HR. — Alcohol in heads draw off = .418
LB. moles per HR. — Reflux to top plate = 83.4869
LB. moles per HR. — Product = 10.8959
LB. moles per HR. — Alcohol in product = 8.90796
LB. moles per HR. — F.O. draw-off = 1.095
LB. moles per HR. — Alcohol in F.O. draw off = .403
LB. moles per HR. — Feed to still = 504.925
LB. moles per HR. — Alcohol in feed = 9.78413
LB. moles per HR. — Stillage exit base = 492.464
LB. moles per HR. — Alcohol in stillage = .055027
W.G. per HR. — Product = 65.4939 from plate nº 31
P.G. per HR. — Heads draw-off = 5.82
W.G. per HR. — Reflux to top plate = 532.022
W.G. per HR. — F.O. draw-off = 4.15 from plate nº 21
P.G. per HR. — F.O.draw off = 5.61
W.G. per HR. — Feed to plate nº 17 = 1 134.79
LBS. per HR. — Steam to calandria = 1 545.83
W.G. per HR. — Stillage exit base = 1 062.74
P.G. per HR. — Alcohol in stillage = .766

# TABLE DES MATIÈRES DE L'ANNÉE

G. ALBAGNAC. — La décarboxylation des acides cinnamiques substitués par les levures ... 133

D. A. ALLAN. — Alcools peu volatils, esters et hydrocarbures dans un rhum brut australien ... 239

M. BURET, Y. CHAMBROY, C. FLANZY. — Métabolisme anaérobie de la baie de raisin en milieu liquide. I. — Aspects méthodologiques ... 205

J. BRICOUT, Y. MÉNORET. — Teneur en isotopes stables du rhum et des principaux alcools de bouche ... 247

P. CARMONA, Juana BELLANATO, A. HIDALGO. — Étude d'huiles essentielles d'orange. I. — Analyse par spectroscopie infra-rouge ... 83

G. CAVAZZA. — La législation du rhum et sa constitution analytique ... 255

Jutta CERNING-BEROARD, A. GUILBOT. — Évolution de la composition glucidique des grains de céréales au cours de leur maturation : maïs, blé, orge ... 143

R. CORDONNIER, C. BIRON, A. DUGAL. — Les invertases du raisin et de *Saccharomyces cerevisiae*. Leur participation respective à l'hydrolyse du saccharose ajouté à la vinification ... 171

R. DELGADO, R. JIMÉNEZ, H. LINARES, C. GUTIÉRREZ. — Culture de levure alimentaire sur les mélanges de vinasse et de mélasse finale de canne ... 287

R. DRAPRON. — Méthode rapide de détermination quantitative des lipides totaux dans les produits céréaliers ... 117

P. DUBOIS, J. RIGAUD. — Étude qualitative et quantitative des constituants volatils du rhum ... 307

P. FEILLET, R. ALARY. — Étuvage du riz. Influence des conditions de traitements et des facteurs variétaux sur les caractéristiques des produits finis ... 11

J. A. P. I'ANSON. — Besoin d'une souplesse maximale dans les distilleries tropicales de l'avenir ... 317

C. JOURET, J. L. PUECH. — Importance de la lignine dans le vieillissement des rhums ... 325

J. LABADIE, Jeanne FOURNAUD, B. L. DUMONT. — Relations entre le pH et la microflore des viandes hachées de bovins ... 193

G. LINDEN, D. LORIENT. — Dosage du fer dans les lactosérums par spectrométrie d'absorption atomique ... 25

O. MALDONADO, R. ESPINOSA, C. ROLZ, A. E. HUMPHREY. — Détails techniques sur un procédé de fabrication d'alcool industriel à partir de canne à sucre ... 335

J. Méjane, J. Piquois. — Appareil de distillation spécialement conçu pour la production d'eaux-de-vie de qualité en continu .................. 343
R. J. Mesley, D. B. Lisle, C. P. Richards, D. F. Wardleworth. — Identification analytique du rhum .................................. 361
K. Misselhorn. — Formation d'acétals dans le rhum : étude cinétique .... 371
A. E. Molini. — Programme de recherche et développement pour l'utilisation intégrale des eaux résiduaires de distillerie de rhum effectué à l'atelier pilote du rhum de la station expérimentation agricole de l'Université de Porto-Rico .................................................. 383
A. E. Molini. — L'usine-pilote de fabrication du rhum de la station expérimentale agricole de l'Université de Porto-Rico, passé, présent et avenir. . 391
M. Namory. — Conservation de crème de levure pour l'alimentation animale 35
S. Nemoto. — Possibilités d'utilisation de bactéries butyriques pour la production de rhum ............................................. 397
H. Olbrich. — Que peut-on trouver dans la littérature sur la production du rhum vieille de plus de 300 ans? ............................ 441
A. Parfait, C. Jouret. — Formation des alcools supérieurs dans les rhums 421
R. Pisani. — La réglementation française du rhum et ses perspectives ..... 437
D. Richard-Molard, R. Drapron. — Extraction et concentration des constituants volatils des grains de céréales en vue de leur analyse par chromatographie en phase gazeuse .................................. 65
J. Rivière, C. Gary, J. C. Vergnaud, J. Cabannes. — Action des champs magnétiques et électriques sur la croissance et le taux des mutations de divers micro-organismes ........................................ 75
C. Rolz, S. de Cabrera, R. Espinosa, O. Maldonado, J. F. Menchu. — La croissance de champignons filamenteux sur les vinasses de distillerie de rhum ............................................... 445
P. de Smedt, P. Liddle. — Place des rhums au sein des eaux de vie ....... 269
H. Suomalainen. — Quelques aspects généraux de la composition de l'arbre des boissons alcooliques ..................................... 453
J.-F. Thibault, J.-P. Robin. — Automatisation du dosage des acides uroniques par la méthode au carbazol. Application au cas des matières pectiques ............................................... 99
E. D. Unger, T. R. Coffey. — Production de rhum léger par la méthode de distillation avec extraction .................................. 469
C. Valin, Olga Palanska, R. Gouttefongea. — Étude de la qualité des viandes de bovin. I. — Étude biochimique de la maturation des viandes de taurillon ................................................ 47
Diego Vargas Guzman. — Techniques utilisées, en fûts de chêne, pour diminuer les pertes par évaporation et pour récupération des fûts .......... 297
M. A. Vijayalakshmi, P. Dupuy. — Extraction du jus de pommes congelées. 1
*Mise au point.*
M. Souty, P. André. — Composition biochimique et qualité des pêches..... 217
*Chronique des livres* ........................................ 115
*Informations* ............................................. 111

CONTENTS

G. Albagnac. — Décarboxylation of subtituted cinnamic acids by yeasts .. 133
D. A. Allan. — Less volatile alcohols, esters and hydrocarbons in a raw Australian rum ... 239
M. Buret, Y. Chambroy, C. Flanzy. — Anaerobic metabolism of the grape berry in liquid medium. I. — Methodologic aspects ... 205
J. Bricout, Ménoret. — Stable isotope content of rum and of the main spirits ... 247
P. Carmona, Juana Bellanato, A. Hidalgo. — Study of orange essential oils. I. — Analysis by infrared spectroscopy ... 83
G. Cavazza. — Legislation and analytical composition of rum ... 255
Jutta Cerning-Beroard, A. Guilbot. — Changes in the carbohydrate composition during maturation of the maize, wheat and barley kernel ... 143
R. Cordonnier, C. Biron, A. Dugal. — The invertases of the grape and *Saccharomyces cerevisae* : their respective participation in the hydrolysis of Saccharose added in vinification ... 171
R. Delgado, R. Jiménez, H. Linares, C. Guitiérrez. — Culture of food yeast on mixtures of slops and cane final molasses ... 287
R. Drapron. — Rapid method for the quantitative determination of total lipids in cereal products ... 117
P. Dubois, J. Rigaud. — Qualitative and quantitative study of rums volatile components ... 307
P. Feillet, R. Alary. — Rice parboiling. Effects of processing conditions and varietal factors on the milled rice characteristics ... 11
J. A. P. I'Anson. — The need for maximum product versatility in tropical distilleries of the future ... 317
C. Jouret, J. L. Puech. — The importance of lignin in the maturing of rum .. 325
J. Labadie, Jeanne Fournaud, B. L. Dumont. — Relationships between the pH and the microflora of beef and veal ground meat ... 193
G. Linden, D. Lorient. — Determination of iron in cheese whey by atomic absorption spectrometry ... 25
O. Maldonado, R. Espinosa, C. Rolz, A. E. Humphrey. — Technical details of a process to manufacture industrial alcohol from sugar cane ... 335
J. Mejane, J. Piquois. — Distillation device specially designed to produce quality brandies in a continuous process ... 343

R. J. Mesley, D. B. Lisle, C. P. Richards, D. F. Wardleworth. — The analytical identification of rum ..... 361
K. Misselhorn. — Formation of acetals in rum : a kinetic study ..... 371
A. E. Molini. — The rum pilot plant of the agricultural experimental station of the university of Puerto Rico : past, present, future ..... 391
A. E. Molini. — The research and developpment program at the rum pilot of the agricultural experiment station of the University of Puerto-Rico for the full utilisation of the rum distillery wastes ..... 383
M. Namory. — Preservation of wet yeast for animal feeding ..... 35
S. Nemoto. — Possibilities of utilization of butyric acid bacteria for rum making ..... 397
H. Olbrich. — What is to be found in literature about rum production that is more than 300 years old? ..... 411
A. Parfait, C. Jouret. — Formation of higher alcohols in rums ..... 421
R. Pisani. — The present and perspective legislation in France concerning rum ..... 437
D. Richard-Molard, R. Drapron. — Extraction and concentration of the volatile constituents of cereal grains with a view to their analysis by gas chromatography ..... 65
J. Riviere, C. Gary, J. C. Vergnaud, J. Cabannes. — Action of magnetic and electric fields on the growth and mutation rate of various microorganisms ..... 75
C. Rolz, S. de Cabrera, R. Espinosa, O. Maldonado, J. F. Menchu. — The growth of filamentous fungi on rum distilling slops ..... 445
P. de Smedt, P. Liddle. — The position of rum in the context of spirits in general ..... 269
H. Suomalainen. — Some general aspects on the aroma composition of alcoholic beverages ..... 453
J. F. Thibault, J. P. Robin. — Automation of uronic acid titration by the carbazol method : application to the case of pectic substances ..... 99
E. D. Unger, T. R. Coffey. — Production of light-bodied rum by an extractive distillation process ..... 469
C. Valin, Olga Palanska, R. Gouttefongea. — Study of the quality of cattle meat. I. — Biochemical study of the aging of young bull meat . 47
Diego Vargas Guzman. — Techniques used to reduce evaporation losses and reclaim casks in the case of oak-casks ..... 297
M. A. Vijayalakshmi, P. Dupuy. — Juice extraction of frozen apple pulp . 1

*Review.*

M. Souty, P. André. — Quality and peaches constituents ..... 217

*Informations* ..... 111

*Books-review* ..... 115

TABLE DES MATIÈRES (*suite*)

S. Nemoto. — Possibilities of utilization of butyric acid bacteria for rum making ........ 397
(Possibilités d'utilisation de bactéries butyriques pour la production de rhum).

H. Olbrich. — What is to be found in literature about rum production that is more than 300 years old? ........ 411
(Que peut-on trouver dans la littérature sur la production du rhum vieille de plus de 300 ans).

A. Parfait, C. Jouret. — Formation des alcools supérieurs dans les rhums ........ 421

R. Pisani. — La réglementation française du rhum et ses perspectives ........ 437

C. Rolz, S. de Cabrera, R. Espinosa, O. Maldonado, J. F. Menchu. — The growth of filamentous fungi on rum distilling slops ........ 445
(La croissance de champignons filamenteux sur les vinasses de distillerie de rhum).

H Suomalainen. — Quelques aspects généraux de la composition de l'arôme des boissons alcooliques ........ 453

E. D. Unger, T. R. Coffey. — Production of light-bodied rum by an extractive distillation process ........ 469
(Production de rhum léger par la méthode de distillation avec extraction).

# RECOMMANDATIONS AUX AUTEURS

Le manuscrit doit être dactylographié sur papier format 21 × 29,7, avec un double interligne, au recto seulement. Chaque page sera numérotée et des feuilles *séparées* seront utilisées pour les références bibliographiques, les tableaux, les légendes des figures et graphiques, etc.

*Au début de chaque mémoire,* on indiquera : — *le titre du mémoire :* il ne devra pas comporter d'abréviations ni de formules chimiques (sauf pour les isotopes) ; — *le nom des auteurs,* précédé des initiales du prénom pour les hommes, du prénom complet pour les femmes ; — *le nom des techniciens* ayant collaboré à l'étude relatée, précédé de la mention : avec la collaboration technique de... ; — *le nom de l'établissement,* dans lequel ont été effectuées les recherches et son adresse.

*Les mémoires* seront rédigés, autant que possible, d'après le plan ci-dessous : a) *résumé* (250 mots max.) suffisamment précis pour que sa lecture renseigne sur la nature du travail et son importance ; b) *introduction* dans laquelle on indique l'objet des recherches entreprises en relation avec les travaux déjà effectués dans le domaine ; c) *techniques expérimentales et matériel utilisé,* en donnant, sous une forme concise, tous les détails nécessaires pour que le lecteur puisse répéter les expériences ; d) *résultats,* à présenter de la manière la plus brève possible ; e) *discussion et conclusions ;* f) *titre et résumé* en anglais ou destinés à être traduit en anglais comportant une analyse *complète* de l'article ; g) *remerciements* pour les collaborations, les fonds, les dons... ; h) *références bibliographiques.*

*Les travaux originaux en anglais* doivent présenter la même composition que les mémoires rédigés en français, mais ils comportent obligatoirement un résumé français *très complet.* Les figures, graphiques tableaux et photographies seront sous-titrés en français.

*Pour les autres documents* (notes, mises au point, revues, rapports, etc.) l'auteur devra suivre un plan logique et le mettre en évidence par une titration appropriée.

*Les références bibliographiques* doivent être citées dans le texte de la manière suivante : (DUPONT et DUVAL, 1954). Lorsque la référence comporte plus de trois auteurs, seul le premier auteur sera mentionné suivi de *et al.* A la fin de l'article, les références constituant la bibliographie doivent être citées par ordre alphabétique des noms d'auteurs, et par ordre de dates pour un même auteur.

*Pour les articles :* le (s) nom (s) de (s) auteur (s) suivi (s) des initiales du (des) prénom (s) ; la date de parution de l'article ; le titre de l'article (dans la langue originale pour l'allemand, l'anglais, l'italien, l'espagnol et en français dans tous les autres cas, avec indication entre parenthèses de la langue d'origine, sauf si l'auteur étranger a sous-titré dans l'une des quatre langues mentionnées) ; le titre du périodique en abrégé, selon la *World List of Scientific Periodicals,* ou le *Bulletin Signalétique du C. N. R. S.* ; le volume ; la première et la dernière page de l'article.

*Pour les ouvrages :* le nom de l'auteur avec les initiales du prénom ; la date de l'édition ; le titre complet de l'ouvrage dans la langue originale, sans abréviations (pour les langues utilisant des alphabets autres que l'alphabet latin, la traduction du titre sera donnée entre parenthèses, avec mention de la langue d'origine) ; le volume ; la première et la dernière page du paragraphe se rapportant aux résultats discutés et, si l'on cite l'ouvrage en entier, le nombre de volumes et le nombre total de pages ; le numéro de l'édition s'il y en a plusieurs ; le nom de l'éditeur ; le lieu de l'édition. Si l'ouvrage est collectif, on indiquera en plus le nom de l'auteur du chapitre cité, le nom des rédacteurs principaux, précédé de la mention « in », le titre de l'ouvrage.

La mention de « communications personnelles » ou « données non publiées » etc. doit être faite entre parenthèses. Lorsque l'auteur a relevé une référence dans une revue d'« Abstracts », le mentionner à la fin de la référence, entre parenthèses.

*Les tableaux, dessins, graphiques, cartes, photographies, doivent être fournis à part.* Les tableaux et figures doivent faire l'objet de deux numérotations distinctes, en chiffres arabes l'une et l'autre.

Les auteurs peuvent disposer leurs tableaux soit dans le sens de la largeur de la revue, soit dans le sens de la longueur. Dans le sens de la largeur, le total des signes et des espaces disponibles est de 100. Dans le sens de la longueur, il est de 155. Les tableaux en longueur, c'est-à-dire ceux pouvant disposer de 155 signes, ne seront admis que s'ils comprennent plus de 8 lignes de chiffres, de manière qu'une page entière de la revue ne soit pas occupée par un tableau très long et très étroit. Les graphiques ne doivent pas faire double emploi avec les tableaux.

Les légendes et les énoncés des graphiques et dessins doivent être dactylographiés sur une même feuille séparée et porter les numéros des figures.

*Les graphiques, schémas, cartes, dessins d'appareils* seront envoyés soit *à l'état définitif* soit *à l'état de projets,* leur exécution définitive étant confiée au Bureau de Dessin de l'I. N. R. A. Seules deux réductions à l'impression sont admises : *soit* × 0,5, *soit* × 0,25.

Il est rappelé que le format utile des *Annales* est : 12,5 × 19,5 cm ; ces dimensions ne doivent pas être dépassées.

*Photographies :* Il est recommandé de fournir des épreuves bien contrastées sur papier blanc, et de préférence en format 9 × 12. Si les photographies doivent être associées pour constituer des planches, on adoptera les normes suivantes : 2 photos : 9 × 12 ; 4 photos : 9 × 5,5 ; 6 photos : 5,5 × 5,5. Dans ce cas, chaque photo devra porter un numéro en chiffres arabes visible après clichage.

Les légendes des photographies doivent être dactylographiées sur une même feuille séparée et porter les numéros des figures.

Il est demandé d'indiquer sur le manuscrit, dans la marge, en regard du texte, l'emplacement souhaité des tableaux et figures.

*Envoi du manuscrit :* Mme COLLON, Station d'Œnologie et de Technologie végétale, 11104 Narbonne, ou M. DUPUY, Chef du Département de Technologie des Produits végétaux, Centre de Recherches de Dijon, 21034 Dijon Cedex. On demande deux exemplaires.

*Correction des épreuves :* les épreuves que les auteurs recevront à corriger sont à retourner, après correction, à Mme COLLON.

*Le Directeur de la publication :* M.-L. CAGNAC

Imprimerie Bussière à Saint-Amand (Cher), France. — 12-1976

*Dépôt légal : 4e trimestre 1976. N° d'impression : 1437*

CCPAP n° 26375